

Aus der Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten
Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie,
Ernährungs- und Alterungsmedizin

(Direktoren: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Stefan Schreiber
und Prof. Dr. med. Jan Heyckendorf)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

*„Der Effekt von oxidiertem Low Density Lipoprotein im Vergleich zu
Zytokin-induzierter Inflammation auf die Differenzierungseigenschaften
von humanen gingivalen mesenchymalen Stammzellen“*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Elena Mahlandt

aus Bremervörde

Kiel (2024)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dominik M. Schulte,
Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie,
Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin,
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.05.2025

gez.: Prof. Dr. Dominik M. Schulte

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhalt

Glossarium.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Metabolische Inflammation.....	1
1.2. Atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen	3
1.2.1 Pathogenese	3
1.2.2 Atherosklerose und Autoimmunität.....	8
1.2.3 Physiologie des Fettstoffwechsels, Lipoproteine und Cholesterin.....	9
1.2.4 Oxidation des Low Density Lipoprotein.....	10
1.3 Das Parodontium und Parodontitis	11
1.3.1 Das gesunde Parodontium.....	11
1.3.2 Parodontitis.....	12
1.3.2.1 Prävalenz.....	12
1.3.2.2 Klassifikation	13
1.3.2.3 Ätiologie	13
1.3.2.4 Pathogenese	14
1.3.2.5 Risikofaktoren	14
1.3.2.6 Parodontitis und Allgemeinerkrankungen.....	16
1.3.2.7 Parodontitis und Atherosklerose	18
1.3.3 Parodontale Regeneration	21
1.4 Humane mesenchymale Stammzellen (MSCs, mesenchymal stem cells).....	22
1.4.1 Definition	22
1.4.2 Identifikation mesenchymaler Stammzellen	23
1.4.3 Adulte Ursprünge mesenchymaler Stammzellen	24
1.4.4 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs).....	24
1.4.5 Immunbiologie mesenchymaler Stammzellen.....	25
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte.....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterial	29
2.1.3 Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien	30
2.1.4 CD-Antigene und -Antikörper.....	31
2.1.5 Fertige Reaktionssysteme.....	32

2.1.6 Primer	32
2.1.7 Sterilisationsverfahren	33
2.2 Zustimmung der Ethikkommission und informierte Einwilligung	33
2.3 Stammzell-Isolation und Kultivierung.....	33
2.4 Passagieren von G-MSCs	34
2.5 Magnetic activated cell sorting (MACS)	35
2.6 Durchflusszytometrische Analyse	37
2.7 Gruppenaufbau	38
2.8 Multilinen Differenzierungspotenzial	39
2.8.1 Osteogene Differenzierung	39
2.8.1.1 Alizarinrot Färbung.....	39
2.8.1.2 Quantitative Analyse der Alizarinrot Färbung	40
2.8.2 Adipogene Differenzierung.....	41
2.8.2.1 Oil Red O Färbung	41
2.8.2.2 Quantitative Analyse der Oil Red O Färbung.....	42
2.8.3 Chondrogene Differenzierung.....	43
2.8.3.1 Paraffinschnitte von Zellpellets.....	43
2.8.3.2 Alcianblau-Kernechtrot Färbung	45
2.8.3.3 Densitometrische Auswertung – Automated digital image quantification.....	45
2.9 Colony Forming Unit (CFU).....	46
2.10 Zellproliferationskurven.....	47
2.11 Gen-Expressionsprofil.....	47
2.11.1 RNA Extraktion	48
2.11.2 Reverse Transkription.....	49
2.11.3 Real-time Polymerase Chain Reaction (rtPCR)	50
2.11.3.1 Grundprinzip der PCR	50
2.11.3.2 Real-time Polymerase chain reaction (rtPCR).....	53
2.12 Statistische Analyse	55
3. Ergebnisse	56
3.1 Durchflusszytometrische Analyse	56
3.2 Multilinen Differenzierung	58
3.2.1 Osteogene Differenzierung	58
3.2.2 Adipogene Differenzierung.....	62
3.2.3 Chondrogene Differenzierung.....	65

3.3 Colony Forming Unit (CFU).....	68
3.4 Zellproliferationskuven	70
3.5 Polymerase chain reaction (PCR).....	71
4. Diskussion	74
4.1 Methodendiskussion.....	75
4.2 Effekte von oxLDL auf die Osteogenese.....	76
4.3 Effekte von oxLDL auf die Adipogenese	81
4.4 Effekte von oxLDL auf die Chondrogenese	85
4.5 Beeinflussung grundlegender Stammzell-Eigenschaften durch oxLDL	87
4.6 Initialer Proliferationsreiz und Induktion der Apoptose.....	90
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis.....	97
7. Abbildungsverzeichnis.....	112
8. Tabellenverzeichnis	113
9. Hervorgegangene Publikationen und Präsentationen dieser Arbeit	113
9.1 Publikation.....	113
9.2 Präsentation.....	113
10. Danksagung.....	114

Glossarium

ACAN	= Aggrecan
Akt	= Proteinkinase B (PKB)
ALP	= Alkaline phosphatase
bFGF	= Basic Fibroblast Growth Factor
β_2 GPI	= beta-2-Glycoprotein
BMP-2	= Bone morphogenetic protein 2
BSA	= Bovines Serumalbumin
cDNA	= complementary DNA (komplementäre DNA)
CD	= Cluster of differentiation
CD36	= Cluster of differentiation 36 (Thrombozytenglykoprotein 4)
CFU	= Colony Forming Unit
CKD	= chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
CO ₂	= Kohlenstoffdioxid
COPD	= chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CRP	= C-reaktives Protein
CVD	= Cardiovascular disease (Herz-Kreislauf-Erkrankungen)
DNA	= deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	= Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	= Epidermal Growth Factor
EGFR	= Epithelial Growth Factor Receptor
eNOS	= endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPCs	= endothelial progenitor cells (Endotheliale Vorläuferzellen)
ET-1	= Endothelin-1
EZM	= extrazelluläre Matrix
6-FAM	= 6-Carboxyfluorescein

FCS	= fötales Kälberserum
FcR	= Fc-Rezeptor
gDNA	= genomic deoxyribonucleic acid (genomische DNA)
G-MSCs	= gingivale mesenchymale Stammzellen
HCl	= Chlorwasserstoff
HDL	= High Density Lipoprotein
HIF-1 α	= Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α
H ₂ O	= Wasser
ICAM-1	= Intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ	= Interferon- γ
IGF-1	= Insulin-like growth factor 1
IL-1 β	= Interleukin-1 β
IL-6	= Interleukin-6
KHK	= Koronare Herzkrankheit
KLF14	= Krüppel-ähnlicher Faktor 14
LDH	= Laktatdehydrogenase
LDL	= Low Density Lipoprotein
LOCI	= Laboratory for Optical and Computational Instrumentation
LOX-1	= Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 (Lectin-ähnlich oxidiertes LDL-Rezeptor-1)
LPL	= Lipoproteinlipase
MCP-1	= monocyte chemoattractant protein-1 (Monozyten-Protein-1)
mCSF	= Macrophage colony-stimulating factor (Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor)
MSC	= mesenchymal stem cell (mesenchymale Stammzelle)
MW	= molecular weight (Molekulargewicht)
NANOG	= Homeobox protein NANOG
NaOH	= Natriumhydroxid
NF- κ B	= nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NIH	= National Institutes of Health
NK-Zellen	= natürliche Killerzellen
NO	= Stickoxid
NOS	= reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
OCT-4	= Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
OD	= optische Dichte
oxLDL	= oxidiertes Low Density Lipoprotein
PAF	= Platelet activating factor (plättchenaktivierender Faktor)
PAFR	= Platelet activating factor receptor
PBS	= Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	= Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	= Platelet-derived Growth Factor
PGK1	= Phosphoglyceratkinase 1
PI3K	= Phosphoinositid-3-Kinase
PPAR	= Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
RNA	= ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNS	= reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	= reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rtPCR	= real time Polymerase Chain Reaction (Echtzeit-PCR)
RT-PCR	= Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RUNX2	= Runt-related transcription factor 2
sFRP5	= soluble frizzled-related protein-5
SOX-2	= sex determining region Y (SRY)- box 2
SOX-9	= SRY-related high mobility group-box gene 9
SPARC	= Osteonectin, auch englisch Secreted protein acidic and rich in cystein
SRs	= Scavenger-Rezeptoren
TLR-2	= Toll-like-Rezeptor 2
TNF- α	= Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	= Vascular cell adhesion molecule 1

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor
VSMCs = vascular smooth muscle cells (vaskuläre glatte Muskelzellen)
VLDL = Very Low density Lipoproteine
WHO = Weltgesundheitsorganisation
Wnt5a = wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member

1. Einleitung

1.1 Metabolische Inflammation

Ein Gleichgewicht des humanen Stoffwechszustands ist entscheidend für die immunologische Funktion eines Organismus. Diese Balance kann durch Entzündungsprozesse gestört werden, deren Ursache unter anderem metabolische Dysfunktionen sind. Die derzeitige globale Entwicklung zeigt eine rapide Zunahme metabolischer Stoffwechselstörungen beispielsweise der Adipositas (Eisenstecken, Gostner, Fuchs, & Überall, 2012) (Hotamisligil, 2017). Angelehnt an Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht man im Jahr 2025 bei jedem Fünften von einer Fettleibigkeit aus. Weltweit betrachtet hat sich die Fettleibigkeit seit 1980 verdoppelt. (Mohammed, Sendra, Lloret, & Bosch, 2018) und seit 1975 beinahe verdreifacht (World Health Organization, 2020).

Dabei stellen der Lebensstil und Umweltfaktoren, das heißt unter anderem Über- und Fehlernährung, ebenso wie klassische Pathogene und autoimmune Prozesse eine Ursache für chronische Entzündungsprozesse im Körper dar. Diese behindern zelluläre Signalkaskaden und führen letztlich zu einer persistierenden Störung der Stoffwechsel- und Immunhomöodynamik. Bezeichnet wird diese spezielle Form als „metabolische Inflammation“ bzw. „Metaflammation“.

Abhängig von der Ernährung kommt es aufgrund einer gestörten Adipozytokinfreisetzung und zirkulierender freier Fettsäuren zu einer pathologischen Zunahme des viszeralen Fettgewebes. Eine Chronifizierung der zunächst milden Entzündungsreaktion resultiert aus einer steigenden Rekrutierung von Immunzellen in das Fettgewebe. Damit wird eine systemische Inflammationsreaktion initiiert mit der Entwicklung einer Insulinresistenz, Dyslipidämie und weiterer pathophysiologischer Mechanismen sowie Auswirkungen auf die Körperperipherie (Eisenstecken, Gostner, Fuchs, & Überall, 2012). Typische Folgen sind Komorbiditäten wie Typ 2 Diabetes mellitus und Fettstoffwechselstörungen, als auch begleitende kardiovaskuläre Erkrankungen und Atherosklerose. Die Dysregulation des Metabolismus betrifft zudem weitere Organsysteme, sodass sich eine Korrelation zur rheumatoiden Arthritis, zur chronischen Darmentzündung und zur zystischen Fibrose aufzeigen lässt. In verschiedenen Geweben gelang der Nachweis einer vermehrten Ansammlung und entzündlichen Polarisierung von Immunzellen, die als Ausgangspunkt für die folgende Stoffwechselstörung angesehen werden (Eisenstecken, Gostner, Fuchs, & Überall, 2012) (Wu & Ballantyne, 2020).

Diverse pro- und antiinflammatorische Modulatoren steuern dabei die Entzündungsreaktion in einer Situation mit chronischer Überernährung (Relling, et al., 2018). Vermutet wird außerdem, dass ein Überangebot an Nahrung in oxidativem Stress resultiert. Die Zelle kann nicht adäquat darauf reagieren und sendet Botenstoffe aus, die das Immunsystem aktivieren und ein nicht aufhaltbarer Entzündungszyklus und pathophysiologische Signalisierung von immuninflammatorischen Zellen und Adipozyten beginnt (Iyer, Fairlie, Prins, Hammock, & L., 2010) (Abbildung 1).

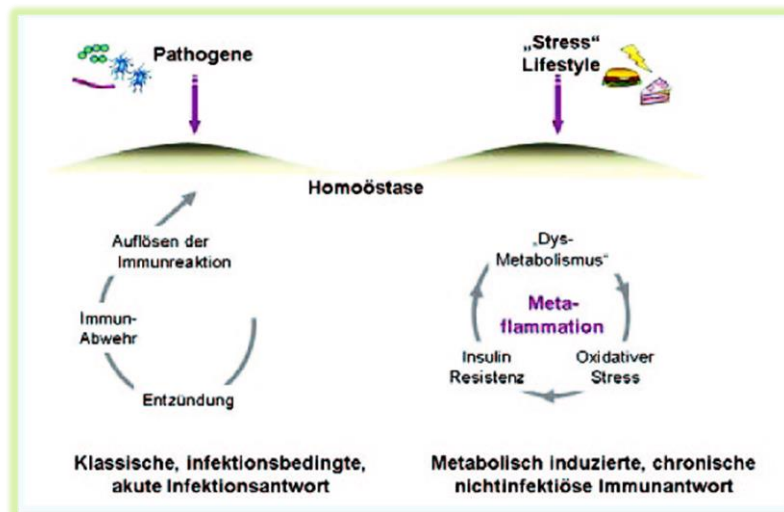


Abbildung 1 Metabolische Inflammation

(Quelle: Molekulare Stoffwechselsensorik bei durch Adipositas induzierter Entzündung; E. Eisenstecken, J.M. Gostner, D. Fuchs, F. Überall; Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin 2012, Vol. 24, Seite 223)

Im Rahmen einer metabolischen Entzündung nehmen Makrophagen eine besondere Stellung ein und führen damit zur Beteiligung aller an der Energiehomöostase zugehörigen Gewebe. Mit zunehmender Adipositas und der weiteren Ausdehnung des Fettgewebes produzieren spezifische M1-Makrophagen proinflammatorische Zytokine. Als Konsequenz steigt die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) und eine mitochondriale Dysfunktion folgt. Die von Makrophagen stammenden ROS scheinen demnach einen wesentlichen Einfluss auf die Adipozytenfunktion zu haben (Hauck, Huang, Hertzell, & Bernlohr, 2019) (Russo, Kwiatkowski, Govorukhina, Bischoff, & Melgert, 2021).

Auf der einen Seite werden Makrophagen selbst durch Exposition gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies induziert und zur Produktion von Abwehrstoffen aktiviert. Auf der anderen Seite sind Makrophagen an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt, die einen Beitrag zur Pathogenese von Entzündung und Atherosklerose leisten (Ishii, Itoh, Sato, & Bannai, 1999).

1.2. Atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. In Europa sterben jährlich 3,9 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen (CVD, cardiovascular disease), was 45 % der gesamten Todesfälle entspricht. Mehrheitlich liegt dabei eine Atherosklerose den CVD zugrunde (Schaftenaar, Frodermann, Kuiper, & Lutgens, 2016) (Roth, et al., 2017). Charakteristisch für die Atherosklerose sind Lipidablagerungen in Teilen der Arterienwandung. Dabei sei darauf hingewiesen, dass es sich nicht um eine Cholesterinspeicherkrankheit, sondern um einen aktiven Prozess mit im Zentrum stehenden Entzündungsmechanismen handelt (Geovanini & Libby, 2018). Über die Proliferation glatter Muskelzellen und der Zunahme der fibrösen Matrix kommt es im Verlauf zur Bildung atherosklerotischer Plaques. Komplikationen stellen eine Ruptur instabiler Plaques, eine Thrombozytenaggregation, eine Stenose und damit Verschluss der Blutgefäße dar. Diese gehen mit verheerenden Folgen, wie Myokardinfarkt und Schlaganfall einher (Zhu, et al., 2018) (Falk, 2006).

1.2.1 Pathogenese

Initiales Ereignis ist die endotheliale Dysfunktion. Das Low Density Lipoprotein (LDL) wird aus dem Lumen in die Gefäßwand transportiert, wo es gebunden an die extrazelluläre Matrix (EZM) im subendothelialen Raum retiniert wird. Dadurch wird das LDL anfällig für oxidative Modifikation aufgrund der Produktion von ROS und reaktiven Stickstoffspezies (RNS, reactive nitrogen species) durch die Endothelzellen (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015). Eine übermäßige Oxidation bzw. ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien oder freien Radikalen auf der einen Seite und Antioxidantien auf der anderen Seite verursacht einen Zustand von oxidativem Stress, welcher sich als potenziell gewebeschädigend und als bedeutsamer Mechanismus in der Pathogenese der Atherosklerose herausgestellt hat (Kattoor, Pothineni, Palagiri, & Mehta, 2017) (Pedroso, et al., 2019). Unter dem Einfluss von Rauchen, arterieller Hypertonie, Hyperglykämie und Hyperlipidämie kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS, die durch Antioxidantien nicht mehr vollständig kompensiert werden kann (Wu, Li, Hou, & Chu, 2017).

Oxidiertes Low Density Lipoprotein (oxLDL) aktiviert Endothelzellen durch die Induktion der Zelloberflächenadhäsionsmoleküle Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), die wiederum das Rollen und Anhaften von Monozyten und T-Zellen auslösen. Die Induktion erfolgt in Abhängigkeit vom Lectin-ähnlich oxidierten LDL-Rezeptor-1 (LOX-1, Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) (Kattoor, Kanuri, & Mehta, Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis, 2019). In humanen atherosklerotischen Läsionen kann man eine LOX-1-Überexpression feststellen. Ebenfalls lässt sich eine Expression des LOX-1 Rezeptors generiert durch die proinflammatorischen Liganden Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interferon-gamma (IFN- γ) eruieren. Zudem hemmt oxLDL über LOX-1 die Stickoxid(NO)-Produktion aus dem Endothel, welches im physiologischen Zustand als kardiovaskulärer Schutzfaktor und Vasodilatator wirkt (Pirillo, Norata, & Catapano, 2013) (Kattoor, Goel, & Mehta, LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis, 2019). Einerseits kann oxLDL selbst chemotaktisch wirken, andererseits stimuliert es glatte Muskelzellen und die Endothelzellen zur Sekretion von Chemokinen wie Monozyten-Protein-1 (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) und Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (mCSF, Macrophage colony-stimulating factor) (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015) (Abbildung 2).

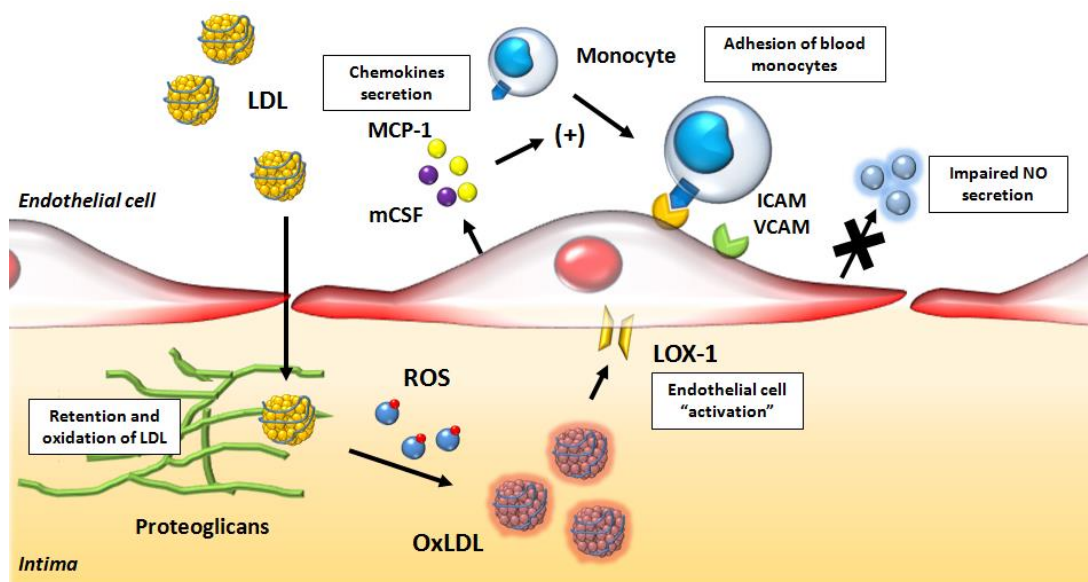


Abbildung 2 Rolle von oxLDL in der endothelialen Dysfunktion

ICAM = Intercellular adhesion molecule 1, LDL = Low Density Lipoprotein, LOX-1 = Lectin-ähnlich oxidiertes LDL-Rezeptor-1, mCSF = Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor, MCP-1 = Monozyten-Protein-1, NO = Stickoxid, oxLDL= oxidiertes Low Density Lipoprotein, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, VCAM = Vascular cell adhesion molecule 1

(Quelle: Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis, E. Leiva, Wehinger, L. Guzmán und R. Orrego, veröffentlicht: 17.9.2015, <https://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>, Zugriff: 23.01.2021)

Die Oxidation des LDL führt somit zur Bildung bioaktiver Lipide mit proinflammatorischer, chemotaktischer Eigenschaft für immunreaktive Zellen und Monozyten. Im Anschluss an die Adhäsion an das Endothel wandern Monozyten in die Intima, wo sie zu Makrophagen differenzieren (Pirillo, Norata, & Catapano, 2013). Die Entzündung im Zusammenhang mit der Atherosklerose ist wesentlich durch die Infiltration mit Makrophagen geprägt, in deren Bereichen sich eine erhöhte Expression von Wnt5a (wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 5a) zeigt. Grund für diese Wnt5a-Induktion ist der Einfluss von oxLDL-Cholesterin auf die Makrophagen (Shao, Zheng, Wang, Xin, Song, & Zhao, 2016). Es folgt die Interaktion des oxLDLs mit Scavenger-Rezeptoren (SRs) auf der Oberfläche der Makrophagen, die zur anschließenden Aktivierung der Immunzellen und Internalisierung des modifizierten LDLs führen. Durch das Inkorporieren von oxLDL entwickeln sich die Makrophagen in der Blutgefäßwand zu sogenannten Schaumzellen (Pirillo, Norata, & Catapano, 2013) (Wu, Li, Hou, & Chu, 2017). Weitere Makrophagen werden von den Schaumzellen durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine angelockt, die in der Folge mit dem Fortschreiten der Entzündung verbunden sind (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015) (Abbildung 3).

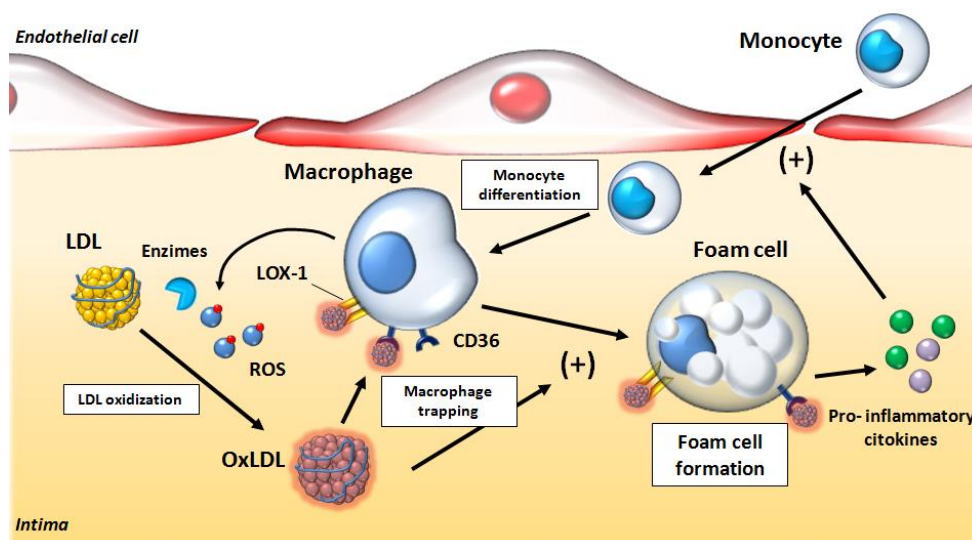


Abbildung 3 Rolle von oxLDL in der Bildung von Schaumzellen

CD36 = cluster of differentiation 36/ Thrombozytenglykoprotein 4, LDL = Low Density Lipoprotein, LOX-1 = Lectin-ähnlich oxidiertes LDL-Rezeptor-1, oxLDL= oxidiertes Low Density Lipoprotein, ROS = reaktive Sauerstoffspezies

(Quelle: Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis, E. Leiva, Wehinger, L. Guzmán und R. Orrego, veröffentlicht: 17.9.2015, <https://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>, Zugriff: 23.01.2021)

Im weiteren Verlauf der Atherosklerose stimuliert oxLDL Endothelzellen und Makrophagen zur Expression vom Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und vom Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) sowie von weiteren Wachstumsfaktoren (EGF = Epidermal Growth Factor, IGF-1 = Insulin-like growth factor 1). Dadurch wird die Migration glatter Muskelzellen aus der Media und deren Proliferation verstärkt. Darüber hinaus werden die glatten Muskelzellen selbst von oxLDL dazu angeregt, viel EZM zu produzieren und ROS zu generieren. ROS führen wiederum zum Zelltod und damit zur Plaqueinstabilität und zu Plaquerissen (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015) (Kattoor, Kanuri, & Mehta, Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis, 2019) (Pirillo, Norata, & Catapano, 2013) (Abbildung 4).

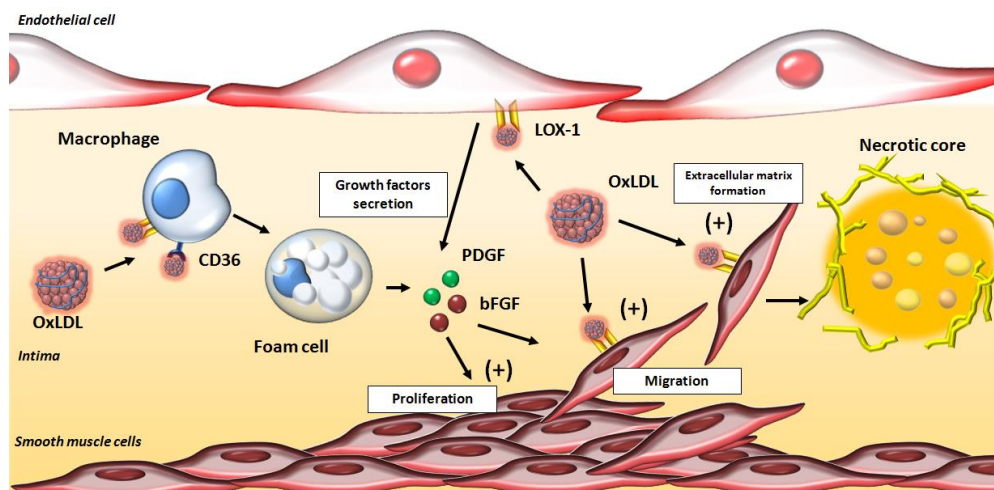


Abbildung 4 Rolle von oxLDL in der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen

bFGF = Basic Fibroblast Growth Factor, CD36 = cluster of differentiation 36/ Thrombozytenglykoprotein 4, LOX-1 = Lectin-ähnlich oxidiertes LDL-Rezeptor-1, oxLDL= oxidiertes Low Density Lipoprotein, PDGF = Platelet-derived Growth Factor

(Quelle: Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis, E. Leiva, Wehinger, L. Guzmán und R. Orrego, veröffentlicht: 17.9.2015, <https://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>, Zugriff: 23.01.2021)

Nachdem eine Plaque aufbricht, kommt es zur erleichterten Thrombenbildung. Thrombozyten, die oxLDL ausgesetzt sind, setzen Chemokine frei, die die atherosklerotische Entwicklung begünstigen und die endotheliale Dysfunktion und Schaumzellbildung fördern. Endothelin-1 (ET-1) bezeichnet ein Peptid, welches durch das Zusammenwirken mit NO die Vasokonstriktion, Entzündung und Proliferation endothelialer Zellen beeinflusst. Im Rahmen der Atherosklerose treten erhöhte Gewebekonzentrationen von ET-1 durch die oxLDL abhängige Stimulation auf. Als Konsequenz werden vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert, die die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Migration und Aktivierung von Monozyten begünstigen (Wu, Li, Hou, & Chu, 2017). Zuletzt entstehen durch die Oxidation neue Epitope, die zur Bildung von Autoantikörpern gegen Apolipoprotein B-Komponenten, Phospholipide sowie gegen Immunkomplexe führen. Unter anderem erhöhen die Antikörper gegen den oxLDL-beta-2-Glycoprotein (β_2 GPI)-Komplex signifikant die Aufnahme des Lipidkomplexes durch Makrophagen. Daher scheinen sie, eine proatherogene Wirkung zu besitzen und die Entzündung zu verstärken (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015) (Abbildung 5).

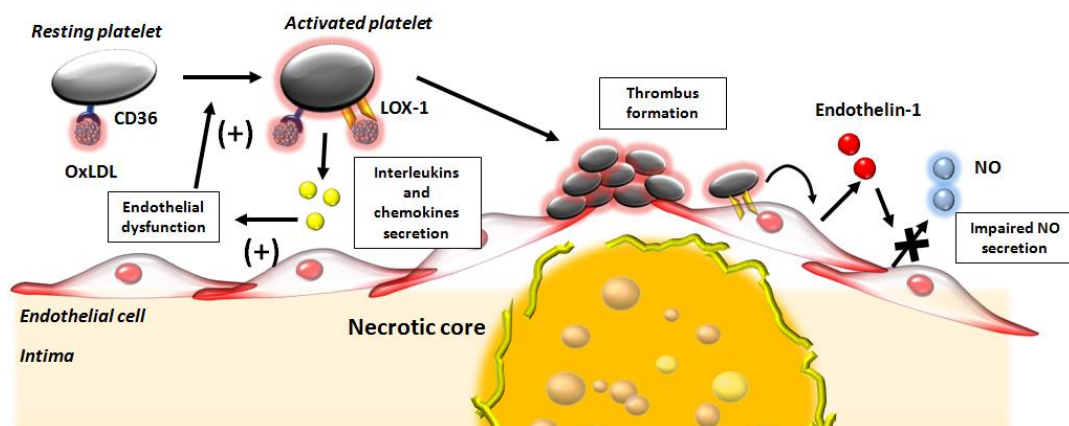


Abbildung 5 Rolle von oxLDL in der proatherosklerotischen Funktion von Thrombozyten

CD36 = cluster of differentiation 36/ Thrombozytenglykoprotein 4, LOX-1 = Lectin-ähnlich oxidiertes LDL-Rezeptor-1, NO = Stickoxid, oxLDL= oxidiertes Low Density Lipoprotein

(Quelle: Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis, E. Leiva, Wehinger, L. Guzmán und R. Orrego, veröffentlicht: 17.9.2015, <https://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>, Zugriff: 23.01.2021)

1.2.2 Atherosklerose und Autoimmunität

Autoimmunerkrankungen werden verursacht durch einen Verlust der Toleranz gegenüber den eigenen Antigenen. Ein vorzeitiges bzw. verstärktes Auftreten von Atherosklerose bei Patienten mit bestimmten systemischen Autoimmunerkrankungen kann durch herkömmliche Risikofaktoren und molekulare Mechanismen bisher nicht vollständig erklärt werden. Oxidativer Stress, der zur Bildung von oxLDL und nachfolgender Komplexbildung mit β_2 GPI führt, wird häufig bei dieser Patientengruppe, ebenso wie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus festgestellt. Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, ob ein hyperlipidämisches Milieu im Organismus mitverantwortlich für die assoziierte Autoimmunerkrankung ist. OxLDL spielt somit nicht nur eine zentrale Rolle bei der Atherosklerose, sondern auch beim Diabetes mellitus und bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015) (Ryu, Kim, Kim, Lee, & Chung, 2019).

Studien lassen ebenfalls Auswirkungen autoimmuner Mechanismen auf die Pathogenese der Atherosklerose vermuten, wobei sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem beteiligt sind. Als risikobehaftete Faktoren für eine Atherosklerose haben sich Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämie bereits etabliert, wohingegen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen weiterhin Diskussionspunkte repräsentieren. Gestützt wird die These durch den Nachweis von Antikörpern gegen oxLDL im Rahmen einer experimentellen Induktion der Atherosklerose (Cinoku, Mavragani, & Moutsopoulos, 2020) (Frostegård, 2002).

1.2.3 Physiologie des Fettstoffwechsels, Lipoproteine und Cholesterin

Lipide weisen eine hydrophobe Molekülstruktur auf und dienen als Energiespeicher, dem Membranaufbau von Zellen und der Signaltransduktion. Eine Differenzierung erfolgt in verschiedene Stoffklassen, zum Beispiel Triglyceride, Cholesterine, Phospholipide und Glykolipide. Der Fettmetabolismus beinhaltet die Synthese neuer Lipide sowie deren Abbau zur Energiegewinnung. Bedeutung haben Lipide als Mediatoren bei Entzündungsreaktionen und werden in Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen, wie Neurodegeneration, Tumoren, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gebracht (Chen, Li, Dong, Wu, Shen, & Chen, 2019).

Anhand ihrer Dichte bzw. der Zusammensetzung ihrer Bestandteile werden die aus Proteinen und Lipiden bestehenden makromolekularen Komplexe, sogenannte Lipoproteine, in Very Low, Low und High Density Lipoproteine klassifiziert. Ihre Oberfläche besteht aus amphipathischen Apolipoproteinen und polaren Lipiden, insbesondere Phospholipide und Cholesterin. Im Kern der Lipoproteine hingegen werden apolare Lipide, wie Cholesterinester und Triacylglycerine eingelagert, sodass Lipoproteine den Transport von Lipiden im Blutkreislauf ermöglichen (Jayaraman, Baveghems, Chavez, Rivas-Urbina, Sánchez-Quesada, & Gursky, 2019).

In der Leber synthetisierte Very Low Density Lipoproteine (VLDL) besitzen die Funktion, extrahepatische Gewebe mit Fettsäuren zu versorgen. Anschließend werden die Partikel in Low Density Lipoproteine (LDL) umgewandelt, die dementsprechend einen geringeren Anteil an Triglyceriden haben, aber mehr Cholesterin beinhalten. Vermittelt über den LDL-Rezeptor kann das in Form von LDL gespeicherte Cholesterin in der Körperperipherie vom Gewebe aufgenommen werden. Bei Erreichen hoher Konzentrationen kommt es zur Ablagerung in den Blutgefäßwänden, was mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht. High Density Lipoprotein (HDL) ist verantwortlich für den entgegengesetzten Transport von den extrahepatischen Geweben zurück zur Leber, wo es über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden wird und damit das kardiovaskuläre Risiko senkt (Rauschert, et al., 2019).

Cholesterin wird als ein essentielles Lipid bezeichnet, welches entscheidend für den Erhalt der zellulären Homöostase ist. Unter anderem stellt es eine Vorstufe für Steroidhormone dar, ist eine Komponente der Plasmamembran und wirkt mit an der intrazellulären Signaltransduktion. Der Cholesterinspiegel wird durch ein komplexes Proteinnetzwerk reguliert, an dem verschiedene Zellorganellen beteiligt sind (Kuzu, Noory, & Robertson, 2016).

1.2.4 Oxidation des Low Density Lipoprotein

Unter Oxidation versteht man einen biochemischen Prozess, bei dem unter Verlust von Elektronen Zellenergie hergestellt wird. Die Produktion von ROS und anderen oxidativen Spezies findet auch im physiologischen Zustand statt. Ein Überschuss wirkt sich allerdings negativ auf den Organismus aus. Es werden zelluläre Komponenten modifiziert, die Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid) geschädigt, Proteine in ihrer Funktion inhibiert und letztlich der Zelltod induziert (Leiva, Wehinger, Guzmán, & Orrego, 2015).

Ein Kennzeichen der Atherosklerose ist die oxidative Veränderung des LDL durch enzymatische und nicht enzymvermittelte Modifikation, wie die Reaktion mit freien Radikalen. Neusten Erkenntnissen zufolge besteht eine gesamte Kaskade an LDL-Modifikationen mit Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften. Ebenso gilt es, verschiedene Stadien und Ausprägungsgrade der Oxidation zu differenzieren. In Abhängigkeit davon resultiert eine fördernde oder hemmende Wirkung von oxLDL auf den Entzündungsprozess. Es wird davon ausgegangen, dass Antioxidantien einen positiven Einfluss haben (Zhang, Xu, & Li, 2014) (Poznyak, et al., 2021).

Durch die Etablierung eines entzündlichen Milieus und Förderung der Lipidablagerung spielt oxLDL eine bedeutsame Rolle in der Atherogenese, wie oben beschrieben. Dabei scheint es beteiligt zu sein an der Plaqueprogression und Plaqueruptur. Bedeutsame Mechanismen sind in dem Zusammenhang die endotheliale Dysfunktion, verminderte NO-Produktion, eine vermehrte Zelladhäsion, die Induktion des Zelltodes und Beeinflussung der Makrophagen (Poznyak, et al., 2021).

Daran anschließend lässt sich feststellen, dass oxLDL in Assoziation mit den pathologischen Begleitzuständen kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Adipositas und dem Metabolischen Syndrom steht (Trpkovic, et al., 2015) (Di Pietro, Formoso, & Pandolfi, 2016). Die physiologischen Serumkonzentrationen betragen bei gesunden Menschen 5,7-14,8 µg/ml, während bei an Diabetes mellitus oder KHK erkrankten Individuen Werte von 18,8-20,2 µg/ml erreicht werden (Lin, et al., 2015).

1.3 Das Parodontium und Parodontitis

1.3.1 Das gesunde Parodontium

Das Parodontium ist definiert als Halteapparat des Zahns und besteht aus den vier folgenden Strukturen:

- Zahnfleisch (Gingiva)
- Wurzelzement (Cementum)
- Kieferknochen (Os alveolare)
- Wurzelhaut (Periodontalligamente)

Die anatomischen Strukturen bilden eine funktionelle Einheit, um den Zahn im Kieferknochen zu verankern (Nanci & Bosshardt, 2006) (Abbildung 6).

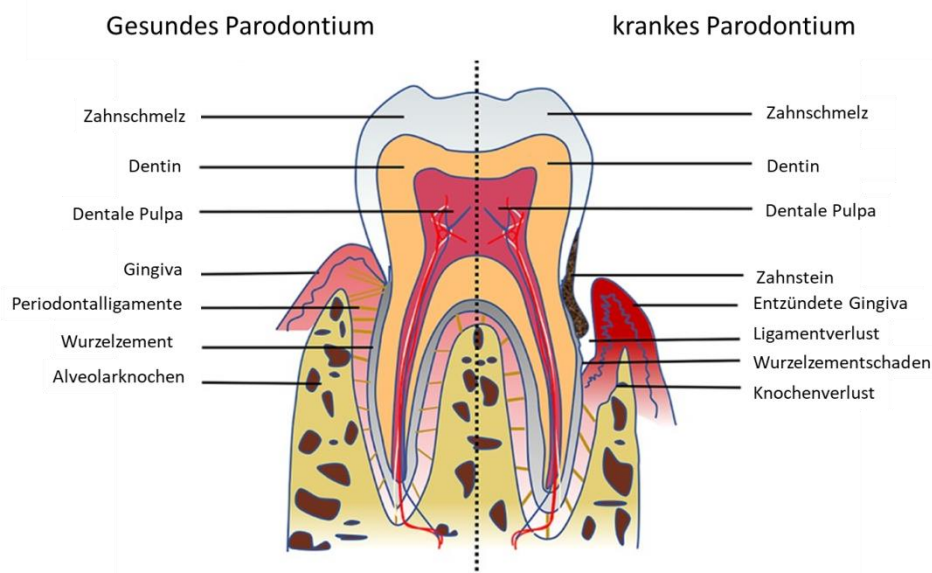


Abbildung 6 Strukturelemente des Zahnhalteapparates

(modifiziert nach: Concise Review: Periodontal Tissue Regeneration Using Stem Cells: Strategies and Translational Considerations, Xu et al., *STEM CELLS Translational Medicine* April 2019, Vol.8, No.4, Seiten 392-403)

Ursprung eines Großteils des Parodontiums ist während der Embryogenese das Ektomesenchym der Neuralleiste. Die Gingiva erstreckt sich von der Mundschleimhautgrenze, der sogenannten mukogingivalen Grenzlinie, bis zu den Zahnhälsen und differenziert sich in freie, befestigte und interdentale Gingiva. Unter dem Zahnfleisch befindet sich der Alveolarfortsatz, die beide fest miteinander verwachsen sind. Histologisch besteht die Gingiva aus mehrschichtigem Plattenepithel und einer Matrix aus dichtem faserartigem Bindegewebe, welches als Lamina propria bezeichnet wird.

Herausragendes Merkmal für das Gewebe ist die ausgesprochen hohe Wundheilungs- und Regenerationsfähigkeit, mit Hilfe derer sich die Gewebearchitektur im Anschluss an eine Läsion oder eine Zahnextraktion schnell wieder rekonstruiert. Dabei verbleiben nur geringe oder keine Hinweise auf Residuen, zum Beispiel in Form von Narbenbildung. Darüber hinaus lässt sich das Gewebe aufgrund der guten Zugänglichkeit für Standardeingriffe chirurgisch präparieren, wobei eine Resektion für den Patienten nur wenig Beschwerden bereitet (Fawzy El-Sayed & Dörfer, 2016) (Gängler, Hoffmann, Willershausen, Schwenzer, & Ehrenfeld, 2005) (Grawish, 2018). Die Wurzelhaut verbindet als kollagenfaserreiches Gewebe, welches aus den Sharpey-Fasern gebildet wird, die Alveolarkortikalis mit dem Zahnwurzelzement. Durch den spezifischen Faserverlauf werden mechanische Belastungen übertragen und absorbiert. Zudem versorgt das parodontale Ligament sich und das umliegende Gewebe des Zahnhalteapparates mit Gefäßen und Nährstoffen (Jiang, et al., 2016).

Der Wurzelzement verbindet die Zahnwurzel mit dem umgebenden parodontalen Ligament sowie mit dem Alveolarknochen. Funktionell bedeutsam ist der Wurzelzement für das Zahnattachement und zum Halten des Zahns in seiner Okklusionsposition (Foster, 2017). Das Aufrechterhalten eines gesunden Parodontiums stellt ein dominierendes Ziel in der Parodontalbehandlung dar. Als parodontale Gesundheit wird ein Zustand definiert, in dem keine entzündlichen Prozesse stattfinden, die Taschen flach ausgebildet sind und kein Zahnfleischbluten auftritt (Li, Thomas, van der Sluis, Tjakkes, & Slot, 2020).

1.3.2 Parodontitis

1.3.2.1 Prävalenz

Erkrankungen des Parodonts werden zu den häufigsten humanen Erkrankungen gerechnet. Dabei ergibt sich für die Parodontitis eine Prävalenz von insgesamt bis zu 45-50 %. An der besonders aggressiven Form einer Parodontitis sind weltweit etwa 11,8 % der Bevölkerung erkrankt. Folglich zählen parodontale Erkrankungen aufgrund der Häufigkeit zu den Gesundheitsproblemen mit großer Relevanz (Kassebaum, Bernabé, Dahiya, Bhandari, Murray, & Marcenes, 2014) (Nazir, 2017).

1.3.2.2 Klassifikation

Die American Academy of Periodontology hat in Zusammenarbeit mit der European Federation of Periodontology im Jahr 2017 eine neue Kategorisierung der Parodontitis vorgenommen. Differenziert betrachtet werden dabei:

Nekrotisierende Parodontalerkrankungen, Parodontitis und die Parodontitis als Manifestation von systemischen Erkrankungen. Die oft in Assoziation mit Immunsuppression auftretende nekrotisierende Parodontitis bezeichnet eine sich rapide verschlechternde Erkrankung mit Nekrose der interdentalen Gingiva, Blutungen und damit einhergehender Schmerzen (Gasner & Schure, 2020). Als Vorstufe bzw. als Risikofaktor für eine Parodontitis wird die Entzündung der zahnumgebenden Schleimhaut, die Gingivitis, angesehen, die bei Progression der Läsion zu einer Parodontitis fortschreitet (Lang & Schätzle, 2009) (Goodson, 2020).

1.3.2.3 Ätiologie

Parodontitis ist die Bezeichnung für eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die sich auf einer Infektion begründet. Modulierende Faktoren für die Auslösung und Progression sind genetischer, umwelt- und verhaltensbasierter Herkunft. Ein Kennzeichen ist die Stimulation der Osteoklastogenese, das heißt der Knochenresorption durch spezialisierte Zellen, und damit die irreversible Zerstörung des Alveolarknochens mit dem konsequenten Verlust des Zahnhalteapparates (Könönen, Gursoy, & Gursoy, 2019) (Amling & Delling, 1996). Ätiologisch nimmt insbesondere eine unzureichende Mundhygiene eine bedeutsame Stellung ein. Aufgrund dessen kommt es zu einer Akkumulation von Bakterien und Plaques auf der Zahnoberfläche. Dieser sich entwickelnde dentale Biofilm stellt wiederum den Auslöser für eine Gingivitis und eine daraus resultierende Parodontitis dar (Gasner & Schure, 2020). Der zahnassoziierte Biofilm und die dentale Plaque sind separat betrachtet jedoch nicht ausreichend für die Induktion einer Parodontitis, sondern bedürfen der destruktiven und entzündlichen Wirtsreaktion auf die mikrobielle Besiedelung (Hajishengallis, 2014).

Unter anderem wirken sich Rauchen, Diabetes, Adipositas, Medikamente und die Ernährung auf die Pathogenese aus. Die Therapie parodontaler Erkrankungen konzentriert sich auf eine Unterbrechung des Biofilms durch nicht-chirurgisches Débridement mit antimikrobiellen und zum Teil entzündungshemmenden Substanzen. Eine effektive Prävention stellt daher die optimale Mundhygiene dar. Neue Therapiefortschritte nutzen Wachstumsfaktoren und biologische Mediatoren zur Regeneration parodontaler Läsionen (Dentino, Lee, Mailhot, & Hefti, 2013).

1.3.2.4 Pathogenese

Ausgangspunkt in der Pathogenese der parodontalen Entzündung ist eine Dysbiose bzw. eine mikrobielle Imbalance kommensaler oraler Bakterien. Dysbiose bedeutet eine vom gesunden Zustand abweichende relative Abundanz einzelner Bakterien. Wenn keine therapeutische Behandlung eingeleitet wird, endet die in Zyklen verlaufende Erkrankung mit der Zerstörung des Parodontiums und dem Verlust des Zahns. Während des Krankheitsverlaufs besiedeln vermehrt anaerobe Organismen die tieferen Parodontaltaschen, zum Beispiel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*. Der betroffene Wirt reagiert darauf im Rahmen einer destruktiven Entzündungsreaktion unter anderem mit der Produktion von inflammatorischen Biomarkern, wie C-reaktivem Protein (CRP), der Freisetzung lysosomaler Enzyme und einer Aktivierung des Komplementsystems. Freigesetzte Enzyme der Bakterien können das Gewebe zusätzlich direkt schädigen und beeinträchtigen reparative Vorgänge von Fibroblasten und Immunzellen.

Die deregulierte und anhaltende chronisch parodontale Entzündung mündet schließlich in einer pathologischen Knochenresorption durch Osteoklasten, den Abbau von ligamentären Fasern und der Bildung von Granulationsgewebe (Gasner & Schure, 2020) (Smalley, 1994) (Hajishengallis, 2014). Als Konsequenz der Entzündungsreaktion folgt eine unkontrollierte Produktion von ROS, welche eine Modifikation von LDL insbesondere zu oxLDL-Partikeln generieren kann. Mit der Behandlung parodontaler Läsionen besteht die Möglichkeit neben der Senkung von proinflammatorischen Markern, auch positive Effekte auf die oxLDL-Spiegel und damit auf das Risiko für die Entstehung einer CVD zu bewirken (Pedroso, et al., 2019).

1.3.2.5 Risikofaktoren

Bei den Risikofaktoren, die eine parodontale Erkrankung begünstigen, unterscheidet man zwischen modifizierbaren und nicht modifizierbaren Aspekten.

Bei Rauchern ist das Risiko eine schwer verlaufende Parodontitis zu bekommen bis zu 3-fach erhöht im Vergleich zu Nicht-Rauchern. Nikotin vermittelt direkt und indirekt in Interaktion mit anderen Modulatoren den Abbau des Gewebes. Die schädigende orale Auswirkung des Rauchens lässt sich durch Entwöhnung verringern und sollte daher mit in die zahnärztliche Behandlung parodontaler Erkrankungen einbezogen werden (Johnson & Hill, 2004) (Nazir, 2017) (Alexandridi, Tsantila, & Pepelassi, 2018).

Unsachgemäße Mundhygiene ist, wie oben beschrieben, verbunden mit einer vermehrten Bildung bakterieller Ablagerungen und Zahnbelag, was die Grundlage für entzündliche Veränderungen im parodontalen Gewebe bildet. Schlechte orale Hygienemaßnahmen einschließlich Zähneputzen, Interdentalreinigung und unregelmäßige Zahnarztbesuche erhöhen das Risiko, eine Parodontitis zu entwickeln um den Faktor zwei bis fünf. Daher sollten Mundhygienegewohnheiten als Intervention im Zusammenhang mit der öffentlichen Gesundheit und explizit bei der Behandlung parodontaler Erkrankungen gefördert werden (Nazir, 2017) (Lertpimonchai, Rattanasiri, Arj-Ong Vallibhakara, Attia, & Thakkestian, 2017) (Jaedicke, Bissett, Finch, Thornton, & Preshaw, 2019).

Weibliche Hormonveränderungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Progression parodontaler Erkrankungen und in der Wundheilung. Hohe Progesteronspiegel vor der Menstruation und während des Eisprungs hemmen die Regeneration von Kollagenfasern und bewirken eine Gefäßdilataion, wodurch eine Gingivitis gefördert wird. Des Weiteren gibt es eine Assoziation zwischen der postmenopausalen Osteoporose und Parodontitis, die beide verschiedene Risikofaktoren, wie Alter, Genetik, hormonelle Veränderungen, Rauchen, Calcium- und Vitamin D-Spiegel, gemein haben. Einen positiven Effekt auf die parodontale und dentale Schädigung zeigte dabei eine Östrogen-Hormontherapie in der Postmenopause (Nazir, 2017) (Mascarenhas, Gapski, Al-Shammari, & Wang, 2003) (Wang & McCauley, 2016).

Die Prädisposition für Infektionen und parodontale Erkrankungen ist abhängig vom Speichelfluss und steigt daher bei abnormer Mundtrockenheit, die als Xerostomie bezeichnet wird. Ursache dafür können Medikamente, chronische Erkrankungen und Radiotherapie im Kopf-Halsbereich sein. Zudem führen einige Arzneimittel, wie Phenytoin, Cyclosporin und Nifedipin, zu einem abnormalen gingivalen Wachstum. Dies wiederum steht einer optimalen Entfernung des Zahnbelags entgegen und potenziert somit eine bereits existente Parodontalerkrankung (Ouanounou, 2016) (Gavriilidou & Belibasakis, 2019) (Nazir, 2017).

In diesem Zusammenhang hat auch Stress einen negativen Effekt auf den Speichelfluss sowie auf das Immunsystem eines Individuums und damit auf die Bildung von dentalen Plaques. Hohe Cortisol-Spiegel im Rahmen ausgeprägter Stresssituationen können das Wachstum bestimmter Pathogene, zum Beispiel *Porphyromonas gingivalis*, beschleunigen. Ebenso zeigen sich bei einer aggressiv verlaufenden Parodontitis höhere Cortisol-Spiegel im Speichel im Vergleich zu parodontal Gesunden oder chronisch Erkrankten. Insgesamt belegen verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen Stress-Exposition und dem Auftreten einer Parodontitis (Pitzurra & Loos, 2020) (Coelho, et al., 2020) (Nazir, 2017) (Botelho, et al., 2018).

Neben den oben aufgeführten beeinflussbaren Risikofaktoren parodontaler Erkrankungen gilt es, nicht modifizierbare Aspekte zu berücksichtigen. Auffällig ist zunächst das signifikant gehäufte Vorkommen mit zunehmendem Lebensalter. Außerdem scheinen hereditäre Faktoren, zusammen mit Umwelt- und demografischen Faktoren in einer komplexen Interaktion miteinander zu stehen, worin eine vermehrte Prädisposition für bestimmte Menschen begründet scheint (Holde, Oscarson, Trovik, Tillberg, & Jönsson, 2017) (Nazir, 2017) (Eke, Borgnakke, & Genco, 2020).

1.3.2.6 Parodontitis und Allgemeinerkrankungen

Parodontale Entzündungen sind mit einer Reihe anderer Erkrankungen verschiedener Organsysteme verbunden. Beispielsweise sind chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD, chronic obstructive pulmonary disease), als auch das Asthma bronchiale und Pneumonien, positiv mit einer chronisch verlaufenden Parodontitis korreliert (Bán, Németh, Szauter, Soós, & Balaskó, 2018) (Gomes-Filho, et al., 2020).

Eine bidirektionale Beziehung lässt sich zwischen chronischer Parodontitis und rheumatoider Arthritis eruieren. An rheumatoider Arthritis erkrankte Personen weisen gehäuft spezifische parodontale Laborwerte und eine erhöhte Prävalenz für eine parodontale Entzündung als verglichene gesunde Kontrollpersonen auf. Schwerwiegende chronische Parodontitiden induzieren Anstiege der rheumatischen Aktivität, die sich durch nicht-chirurgische parodontale Therapie vermindern lässt (Wen, Beltrán, Chaparro, Espinoza, & Riedemann, 2019) (Rodríguez-Lozano, et al., 2019).

Auf ähnliche Weise gibt es eine Assoziation zwischen chronischer Nierenerkrankung (CKD, chronic kidney disease) und Parodontitis, die sich gegenseitig negativ beeinflussen und Ursache für systemische Entzündungsreaktionen im Körper sein können (Hickey, Shalamanova, Whitehead, Dempsey-Hibbert, van der Gast, & Taylor, 2020) (Lertpimonchai, et al., 2019). Mit Hauptfokus auf die systemische Entzündung parodontaler Erkrankungen beschreiben Studien eine Relation zum Gesamtkrebsrisiko, wobei es für diese These noch keine konkreten Belege vor allem im Hinblick auf den Beweis der vermuteten Kausalität gibt (Michaud, Fu, Shi, & Chung, 2017) (Nwizu, Wactawski-Wende, & Genco, 2020).

Weiterhin diskutiert wird derzeit ein Zusammenhang zwischen der Mundgesundheit und der Entwicklung kognitiver Beeinträchtigungen und einer Alzheimer Demenz. Dabei wird vermutet, dass Parodontitis durch Induktion einer systemischen Entzündung einen Beitrag zur Neuroinflammation leistet (Wu, Fillenbaum, Plassman, & Guo, 2016) (Nascimento, et al., 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit gilt es die Assoziation zwischen Parodontitis und vaskulären Risikofaktoren bzw. Krankheitszuständen zu betonen. Diese Risikofaktoren können sowohl eine Entzündung im gingivalen Gewebe als auch in der Arterienwandung fördern. Dazu zählen neben dem Rauchen Erkrankungen des metabolischen Formenkreises: Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Dyslipidämie und Übergewicht (Gianos, et al., 2021).

Die Stoffwechselstörung Diabetes mellitus wird repräsentiert durch hyperglykämie Zustände, die sich auf Mängel in der Insulinproduktion bzw. –Wirkung zurückführen lassen. Zwischen Diabetes und Parodontitis besteht eine bidirektionale Wechselwirkung. Das heißt, dass Diabetes einerseits mit einer mangelhaften oralen Hygiene einhergeht und für die Pathogene eine optimale Mikroumgebung schafft. Mit erhöhter Wahrscheinlichkeit werden neben dem Auftreten auch der Schweregrad und die Progression einer Parodontitis begünstigt. Andererseits beeinträchtigt eine Parodontitis die kontrollierte Blutzuckereinstellung, fördert die Entstehung einer Insulinresistenz und wirkt sich negativ auf diabetische Komplikationen, wie CVD und Nierenerkrankungen aus. Sowohl die Blutzuckerkontrolle als auch die vaskuläre Funktion kann durch eine intensive Parodontaltherapie maßgeblich verbessert werden. Als weitere Verbindung zwischen den beiden Erkrankungen werden erhöhte systemische Entzündungsmediatoren, wie CRP, TNF- α und Interleukin-6 (IL-6) vermutet. Des Weiteren scheint oxidativer Stress über die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege Diabetes und Parodontitis miteinander zu verknüpfen. Für die Behandlung eines Diabetes bedeutet dies, dass eine parodontale Behandlung den Therapieerfolg steigern kann, indem unter anderem das glykosylierte Hämoglobin reduziert wird (Liccardo, et al., 2019) (Genco, Graziani, & Hasturk, 2020) (Nazir, 2017) (Stanko & Izakovicova Holla, 2014) (Nascimento, Leite, Vestergaard, Scheutz, & López, 2018) (D'Aiuto, et al., 2018).

Zunehmend verdeutlicht sich in den letzten Jahren die positive Korrelation zwischen einer Hyperlipidämie und einer Parodontitis, wobei pathognomonisch die bidirektionale Beziehung zwischen Entzündung und Lipidstoffwechsel ist. Für das Parodontium pathogene Bakterien, ihre Metabolite und entzündungsfördernde Zytokine stellen eine Beeinträchtigung für den Fettstoffwechsel dar. Sie verursachen eine vermehrte Lipidperoxidation, erhöhen die Lipidwerte im Blut und führen zu einer proatherogenen Veränderung des Lipoproteinstoffwechsels. Dem gegenüber steht der Einfluss einer Hyperlipidämie und der Lipidperoxidation auf das Immunsystem. Es resultieren Störungen in der Immunregulation, vermehrt exprimierte proinflammatorische Zytokine, oxidativer Stress, eine stagnierte Heilung von Wunden und letztlich die Prädisposition, eine Parodontitis zu entwickeln (Schenkenbein & Loos, 2013) (Liu, et al., 2020).

Auch Bluthochdruck und schwere Parodontitis scheinen über eine schlechte Mundhygiene als unabhängiger Risikofaktor positiv miteinander zu korrelieren. Über eine gute Mundhygiene könne eine Verbesserung des Entzündungszustandes und damit der endothelialen Funktion erreicht werden (Choi, Han, Park, & Park, 2015) (Gianos, et al., 2021).

Das Rauchen von Zigaretten konnte in Studien mit einem vermehrten Zahnverlust und Knochenabbau verknüpft werden. Möglicherweise sind ein Anstieg von oxidativem Stress, die vermehrte Expression von inflammatorischen Zytokinen und Veränderungen der oralen Mikroflora die Ursache. Ebenfalls ist das Rauchen bekannt für eine Erhöhung des CVD-Risikos (Kondo, Nakano, Adachi, & Murohara, 2019) (Gianos, et al., 2021).

Zudem gibt es Hinweise, dass Adipositas einen Risikofaktor für eine Parodontitis darstellt, indem durch die Erhöhung von oxidativem Stress die Destruktion des Gewebes induziert wird. Weiterhin wird angenommen, dass die mit Adipositas assoziierte systemische Entzündung zur Entwicklung einer Parodontitis beiträgt. Damit bestehe ein vergleichbarer Zusammenhang wie zwischen einer Fettleibigkeit und chronisch entzündlichen Erkrankungen, zum Beispiel CVD. Von Nachteil erweist sich ein Übergewicht auch im Rahmen parodontaler Maßnahmen durch ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie (Khader, Bawadi, Haroun, Alomari, & Tayyem, 2009) (Nazir, 2017) (Keller, Rohde, Raymond, & Heitmann, 2015). In diesem Zusammenhang sollte auch die Ernährungsqualität berücksichtigt werden. Insbesondere die Aufnahme raffinierter Kohlenhydrate als auch gesättigter Fette vermitteln eine vermehrte Entzündung, Zahnkaries und Parodontitis (Iwasaki, et al., 2011) (Lula, Ribeiro, Hugo, Alves, & Silva, 2014) (Gianos, et al., 2021).

1.3.2.7 Parodontitis und Atherosklerose

Neben den gemeinsamen Risikofaktoren besteht zuletzt ebenso ein Konsens bei der Assoziation zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Parodontitis. Dabei zeigt sich bei vorbestehender Parodontalerkrankung, eine insgesamt um 19 % erhöhte Gefährdung kardiovaskulär zu erkranken. Von Bedeutung ist die unterschiedliche Verknüpfung zu den Untergruppen einer CVD. Demzufolge ergibt sich ein stärker ausgeprägter Zusammenhang zwischen Parodontitis und Schlaganfall und peripherer Arterienerkrankung verglichen zu einer koronaren Herzerkrankung (Nazir, 2017) (Almeida, Fagundes, Maia, & Lima, 2018). Es werden verschiedene Mechanismen angenommen, die eine Verknüpfung zwischen den beiden Krankheitsentitäten verursachen.

Da es sich bei der Atherosklerose um eine chronisch entzündliche Erkrankung handelt, wird diskutiert, ob andere Entzündungszustände im Körper zur Entstehung und Progredienz der Atherosklerose beitragen. Bisher konnte eine Kausalität nicht eindeutig belegt werden.

Als Ursache werden unter anderem parodontale Bakterien genannt, die direkt die endothelialen Zellen infizieren und durch mitochondriale Fragmentierung schädigen. Über lipopolysaccharidvermittelte Wirkungen wird eine endotheliale Dysfunktion ausgelöst und letztlich die Plaquebildung sowie -Ruptur im Rahmen einer CVD gefördert (Dorn, Dunn, & Progulske-Fox, 1999) (Czerniuk, Stanisław Surma, Romańczyk, Nowak, Wojtowitz, & Filipiak, 2022). Durch alltägliche Aktivitäten, beispielsweise Zähne putzen und kauen von Nahrungsmitteln, gelangen Bakterien in den Blutkreislauf und induzieren eine Bakteriämie. Das Ausmaß und die Häufigkeit einer Bakteriämie lassen sich in Abhängigkeit von einer parodontalen Entzündung steigern. Im Folgenden konnten Bakterienspeziesbestandteile in atheromatösen Läsionen nachgewiesen werden, welche die Pathophysiologie der Atherosklerose beschleunigen. Parodontale Erreger lösen zudem eine Hyperreaktivität der peripheren Blutneutrophilen aus mit Stimulation der Produktion von ROS. Neben der vermehrten Synthese weisen die ROS aufgrund reduzierter Antioxidantien eine intensiviertere Aktivität bei Parodontitis auf (Sanz, et al., 2020) (Gianos, et al., 2021) (Febbraio, Roy, & Levin, 2022).

Porphyromonas gingivalis bezeichnet ein Hauptpathogen der Parodontitis, welches über einen CD36-abhängigen Weg eine Entzündung hervorruft. CD36 spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose, wie oben dargelegt, und kann damit ein Target für einen möglichen kausalen Zusammenhang und ein therapeutisches Ziel repräsentieren (Rekhi, Catunda, Alexiou, Sharma, Fong, & Febbraio, 2021). Außerdem sind die parodontalen Pathogene über verschiedene Mechanismen in der Lage, die Progression einer Atherosklerose voranzutreiben, zum Beispiel über die vermehrte Oxidation von Lipiden, die verstärkte Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen sowie die Bildung von Schaumzellen (Kim, et al., 2018) (Cao, Ji, Luo, & Zhong, 2015) (Czerniuk, Stanisław Surma, Romańczyk, Nowak, Wojtowitz, & Filipiak, 2022).

Zunehmend wird auch das Darmmikrobiom als Verknüpfung zwischen den Krankheitsentitäten in Betracht gezogen. Das Mikrobiom verändert sich dabei in Abhängigkeit von Parodontalerkrankungen und hat Einfluss auf Entzündungsprozesse (Ahmadmehrabi & Tang, 2017) (Febbraio, Roy, & Levin, 2022).

Weiterhin wird postuliert, dass eine Parodontitis eine systemische Entzündung und oxidativen Stress verstärkt. Ein Beitrag zur Atherosklerose wird dann über die Erhöhung des bereits vorhandenen chronischen Entzündungszustands geleistet. In diesem Zusammenhang konnten verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie CRP und IL-6, sowie Endothelzelladhäsionsmoleküle identifiziert werden, die mit dem Fortschreiten einer atherosklerotischen CVD in Verbindung gebracht werden (Gianos, et al., 2021) (Febbraio, Roy, & Levin, 2022). Diese proinflammatorischen Mediatoren nehmen unter anderem Einfluss auf die Pathophysiologie der Atherosklerose und lassen sich durch eine angemessene Parodontal-Therapie signifikant senken. Laborchemisch zeigen sich bei Parodontitis-Patienten ebenfalls für eine Dyslipidämie typische Werte mit erhöhten Konzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL und oxLDL, wohingegen die HDL-Spiegel verglichen mit Kontrollen erniedrigt sind (Sanz, et al., 2020).

Unerklärt bleibt dabei jedoch, welche klinische Relevanz kardiovaskulären Risikofaktoren zugeschrieben werden kann. In verschiedenen Studien konnte durch eine intensive Parodontalbehandlung kein einheitliches Ergebnis erzielt werden. Eine Verbesserung der CVD-Surrogatparameter, wie Blutdruck, Lipidprofil, Indikatoren für Herzschäden oder einer endothelialen Dysfunktion, ging nicht konsequent mit weniger CVD-Ereignisse einher (Febbraio, Roy, & Levin, 2022).

Zuletzt gibt es einige Veränderungen und Mutationen in bestimmten Genen, die sich phänotypisch unterschiedlich manifestieren können. Dieses als Pleiotropie bezeichnete Phänomen steht im Verdacht, für die epidemiologischen Zusammenhänge zwischen Parodontitis und CVD verantwortlich zu sein (Sanz, et al., 2020).

Abschließend bleiben die genauen kausalen mechanistischen Zusammenhänge zwischen einer Parodontitis und CVD ungeklärt. Eine Ursache-Wirkungs-Beziehung kann bei vielen Störfaktoren und gleichzeitig vorliegenden gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismen und Risikofaktoren bisher nicht beschrieben werden. Somit muss sich auch die Frage gestellt werden, was passiert, wenn der verursachende Mechanismus Auswirkungen auf Stammzeleigenschaften hat, die trotz Parodontalbehandlung und oraler Mundhygiene fortbestehen.

1.3.3 Parodontale Regeneration

Aufgrund der funktionellen Adaptation besitzt das parodontale Gewebe eine charakteristische hohe Regenerationsleistung. Es entwickelt sich ein Gleichgewicht von Resorption und Apposition, was zum stetigen Remodelling des Alveolarknochens beiträgt (Möbius, 2016). Therapeutisch stehen die Kontrolle der Infektion und die Eindämmung des Entzündungsprozesses im Mittelpunkt der Parodontitis-Behandlung (Nuñez, Vignoletti, Caffesse, & Sanz, 2019). Es lassen sich grob drei ineinander übergehende Therapiephasen unterscheiden. Zu Beginn zielt die Behandlung darauf ab, die fortschreitende Destruktion des parodontalen Gewebes durch Mundhygiene, Zahnsteinentfernung und Wurzelglättung zu beenden. Der zweite Abschnitt konzentriert sich auf die Korrektur von Funktion und Ästhetik des Gewebes, während es in der dritten Phase um den Erhalt und die Prophylaxe geht, damit ein erneutes Auftreten einer Parodontitis verhindert wird. Der Fokus dieser Maßnahmen liegt primär auf der Stabilisierung des Befundes (Hernández-Monjaraz, Santiago-Osorio, Monroy-García, Ledesma-Martínez, & Mendoza-Núñez, 2018).

Ein Schwerpunkt in der regenerativen Zahnmedizin stellt die Ergänzung der konventionellen Therapie einer Parodontitis um die Regeneration parodontaler Läsionen dar. In diesem Zusammenhang wurden vorwiegend in den letzten Jahren Fortschritte in der Stammzelltherapie und im Tissue Engineering erreicht (Chen F. , 2017) (Nuñez, Vignoletti, Caffesse, & Sanz, 2019). Eine potenzielle Therapie stellt die Transplantation exogen gewonnener mesenchymaler Stammzellen oder die Mobilisierung endogener Stammzellen aus ihren Nischen dar, die physiologisch für die Geweberegeneration im Körper zuständig sind. Zudem bestehen weitere vielversprechende Ansätze, wie die Gentherapie oder die Verwendung von genau bemessenen biomimetischen Gerüsten, die mit Hilfe des Prinzips eines 3D-Drucks hergestellt werden (Ledesma-Martínez, Mendoza-Núñez, & Santiago-Osorio, 2019) (Liu, et al., 2019).

1.4 Humane mesenchymale Stammzellen (MSCs, mesenchymal stem cells)

1.4.1 Definition

Für Stammzellen charakteristisch sind ihr Potenzial zur Selbsterneuerung und die Fähigkeit, sich in unterschiedliche Zelllinien zu differenzieren. Die asymmetrische Teilung hat eine klonale Tochterstammzelle und eine Zelle als Ergebnis, die weiter proliferiert und sich variabel differenzieren kann (Abbildung 7). Voneinander abgegrenzt werden adulte von embryonalen Stammzellen. Die Gewinnung der embryonalen Stammzellen erfolgt aus dem Inneren der Blastozyste in den frühen Stadien der Embryogenese, was ethische als auch rechtliche Fragestellungen mit sich bringt. Darüber hinaus werden diese Zellen mit der Karzinogenese, also der Entstehung von Tumoren, in Korrelation gebracht. Aufgrund dessen fokussiert sich die Forschung auf adulte Stammzellen, die als multipotente Zellen in der Lage sind, lädiertes Gewebe zu reparieren und für einen schnellen Ersatz von Zellen mit hohem Umsatz zu sorgen. Mesenchymale Stammzellen (MSCs, mesenchymal stem cells) entstammen dem Stroma eines Organs, das heißt dem stützenden lockeren Bindegewebe, und verfügen über die typischen Stammzeleigenschaften der Autoregeneration und der mehrstufigen Differenzierung. Ihre Funktion erfüllen MSCs in der Wundheilung, dem Gewebewachstum und dem Ersatz von Zellen, die sich zum Beispiel exfoliativ von der Haut ablösen oder unter pathologischen Verhältnissen absterben (Ding, Shyu, & Lin, 2011) (Hernández-Monjaraz, Santiago-Osorio, Monroy-García, Ledesma-Martínez, & Mendoza-Núñez, 2018).

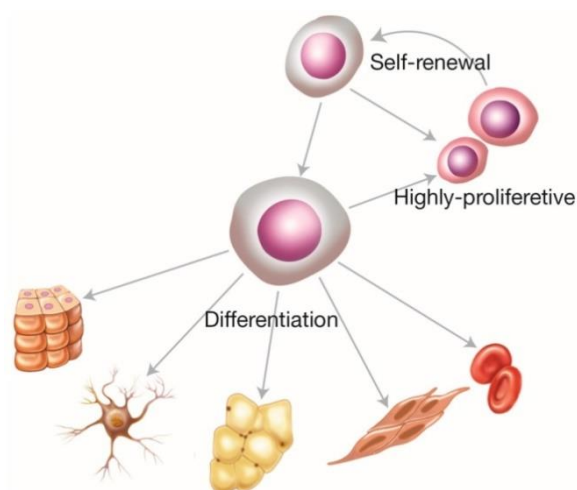


Abbildung 7 Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Das Schema zeigt die Charakteristika einer MSC einschließlich der Selbstregeneration, Replikation und der Multiliniendifferenzierung in Epithel-, Fett-, Muskel-, Nerven- und hämatogene Zellen.

(Quelle: Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review; B. Hernández-Monjaraz, E. Santiago-Osorio, A. Monroy-García, E. Ledesma-Martínez, V.M. Mendoza-Núñez; *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, No. 4, Seite 944, April 2018)

Abhängig von der Quelle aus der die Stammzellen gewonnen werden, besitzen sie eine unterschiedliche Potenz zur Weiterentwicklung. Eine Differenzierung in sämtliche drei Keimblätter, Endoderm, Mesoderm und Ektoderm, ist nur den pluripotenten Zellen möglich, zu denen die embryonalen Stammzellen gerechnet werden. Multipotente Stammzellen hingegen können sich nur in Zellen weiterentwickeln, die einem Keimblatt zugerechnet werden. Beispielsweise gelten mesenchymale Stammzellen als multipotent und können sich dementsprechend in Fett-, Knorpel- und Knorpelgewebe ausdifferenzieren. Zellen, die verschiedene Zelltypen eines spezialisierten Gewebes bilden können, werden als oligopotent bezeichnet. Unter anderem werden diese von gewebsresidenten Stammzellen repräsentiert (Kolios & Moodley, 2013). Besitzt eine Zelle lediglich die Fähigkeit, sich in Zellen desselben Typs zu differenzieren, wird sie als unipotent definiert. Mit Erfolg konnten Stammzellen im Rahmen einer Knochenmarktransplantation bei Patienten eingesetzt werden, die an einer Leukämie, Anämie oder einem Immundefekt erkrankt sind. Ebenso kann mit aus der Haut gewonnenen Stammzellen die Wundheilung bei schweren Verbrennungen gefördert und geschädigte Hornhaut mit Hilfe von limbalen Stammzellen regeneriert werden. Insgesamt weist die Therapie mit Stammzellen ein ausgesprochen hohes therapeutisches Potenzial auf (Dulak, Szade, Szade, Nowak, & Józkwicz, 2015).

1.4.2 Identifikation mesenchymaler Stammzellen

Zur einheitlicheren Charakterisierung und besseren Kommunikation gibt es Vorschläge des Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee der International Society for Cellular Therapy bezüglich minimaler Kriterien zur Definition von humanen MSCs. Dazu zählt die Proliferation plastikadhärenter Zellen unter Standardkulturbedingungen, wobei sich morphologisch ein fibroblastenähnliches Bild zeigt. Neben dem Potenzial zur Kolonienbildung wurde eine multipotente Differenzierung als Charakteristikum definiert, wobei verschiedene Zelllinien eingeschlossen werden, wie Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten. Als weiteren Aspekt wird die Ausbildung spezifischer Proteine auf der Oberfläche der Zellen vorgegeben. Dabei handelt es sich um die Expression von CD105, CD73 und CD90, wohingegen CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR-Moleküle nicht auf der Zelloberfläche vorhanden sein dürfen (Dominici, et al., 2006) (Venkatesh, Kumar, & Alur, 2017).

1.4.3 Adulte Ursprünge mesenchymaler Stammzellen

Im adulten Organismus gibt es eine große Anzahl an Ursprungsgeweben, die sich zur Isolation von MSCs eignen. Auf der Basis einer praktikablen Entnahme ausreichender Mengen Gewebe kommen unter anderem die Nabelschnur, Endometriumpolypen, Menstruationsblut, Knochenmark, Haut und Fettgewebe in Betracht (Ding, Shyu, & Lin, 2011). Des Weiteren können auch aus dem orofazialen Bereich MSCs separiert werden, wobei zu Beginn Stammzellen aus der Zahnpulpa des dritten Molarzahns zur Verfügung standen. Es folgte die Isolation von MSCs aus den Milchzähnen sowie den bleibenden Zähnen, aus der apikalen Papille, den dentalen Follikelzellen und dem parodontalen Ligament. MSCs sind als kleine Subpopulation im humanen parodontalen Ligament enthalten und mittels Differenzierung in Osteoblasten, Fibroblasten und Zahnzementoblasten für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion des den Zahn umgebenden ligamentähnlichen Gewebes verantwortlich. Stammzellen aus der apikalen Papille und die dentalen Follikelzellen lassen sich nur im sich entwickelnden Zahnkeim identifizieren. Die aus der Neuralleiste entstammenden dentalen Pulpastammzellen können sich mit einer hohen Proliferationsrate in Chondrozyten, Adipozyten und Odontoblasten differenzieren, wobei daneben auch eine Reprogrammierung zu Myozyten und Neuronen realisierbar ist. Von Bedeutung für die Differenzierung ist das umgebende Mikroenvironment, wie verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren oder Proteine der extrazellulären Matrix (Hernández-Monjaraz, Santiago-Osorio, Monroy-García, Ledesma-Martínez, & Mendoza-Núñez, 2018)

1.4.4 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs)

In der Entwicklungsgeschichte bildet das kraniofaziale Ektomesenchym das gemeinsame Ursprungsgewebe der oralen Weichgewebe. Die anatomische Besonderheit des parodontalen gingivalen Bindegewebes liegt in der zusätzlichen Formation aus dem perifollikulären Mesenchym, welches die äußere Schicht des Dentalfollikels bildet. Weiterhin sind auch Zellen des parodontalen Ligaments, die dem Inneren des Dentalfollikels entspringen, und der eigentliche Dentalfollikel an der Genese der gingivalen Lamina propria beteiligt. Funktionell sind gingivale Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung durch eine hohe Reaktionsfähigkeit auf Wachstumsfaktoren und durch die Produktion spezieller extrazellulärer Matrixproteine gekennzeichnet.

Die vielfältigen Funktionen implizieren das Vorhandensein heterogener Zellen sowie die Existenz der dafür grundlegenden residenten adulten mesenchymalen Stamm- bzw. Progenitorzellen, die letztlich aus der gingivalen Lamina propria isoliert werden (Fawzy El-Sayed & Dörfer, 2016) (Venkatesh, Kumar, & Alur, 2017) (Grawish, 2018). Die Kontrolle durch die International Society for Cellular Therapy prüfte die Übereinstimmung mit den minimalen Kriterien bezüglich des Phänotyps und der Funktion humaner MSCs und konnte die G-MSCs demzufolge als solche anerkennen (Dominici, et al., 2006) (Venkatesh, Kumar, & Alur, 2017).

Mit Hinblick auf die Eigenschaften der G-MSCs gibt es zahlreiche Bemühungen, sie in der regenerativen medizinischen Therapie einzusetzen, zum Beispiel in der kutanen Wundheilung, in der Regeneration von Sehnen, Knochendefekten, parodontalen Läsionen inklusive der oralen Mukositis, in der kollageninduzierten Arthritis oder aufgrund ihrer antitumorösen Effekte. G-MSCs zeichnen sich durch eine leicht zugängliche Isolation und hohe Abundanz aus, wobei kleine Biopsien aufgrund der hohen Proliferationsrate ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren ausreichen. In genetischen Analysen weisen G-MSCs im Vergleich zu den sonst präferierten Knochenmarkstammzellen einen stabilen Phänotyp, eine regelrechte Karyotypisierung und Telomerase-Aktivität auf, die während der Kultivierung über einen längeren Zeitraum unverändert bleiben. Außerdem setzen sie keinen zusätzlichen aktivierenden Stimulus in der Tumorgenese (Venkatesh, Kumar, & Alur, 2017).

Die Möglichkeit zur Isolation von G-MSCs besteht sowohl im gesunden als auch im entzündeten Zustand der Gingiva. Defektes Parodontium besitzt trotz Inflammation stets ein Potenzial zur Heilung, was durch die Existenz MSC-ähnlicher Zellen bewiesen wird. Diese Zellen sind mit der Kompetenz zur Multiliniendifferenzierung befähigt und werden im Kontext mit einer Immunmodulation betrachtet (Grawish, 2018). Verglichen mit anderen MSCs werden den aus der Gingiva extrahierten MSCs eine stärkere antiinflammatorische und immunmodulatorische Funktion auf die Zellen des angeborenen Immunsystems zugeschrieben (Liu, et al., 2020).

1.4.5 Immunbiologie mesenchymaler Stammzellen

Neben der Aufrechterhaltung und Reparatur von Geweben erfüllen MSCs vielfältige weitere Funktionen und sind unter anderem an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Unter Berücksichtigung ihrer immunsuppressiven Funktion konnten sie in schwer ausgeprägten degenerativen und entzündlichen Erkrankungen als therapeutische Intervention eingesetzt werden (Naji, Eitoku, Favier, Deschaseaux, Rouas-Freiss, & Suganuma, 2019) (Munir, Ward, & McGettrick, 2018).

Adulte MSCs vermindern die Proliferation von T-Zellen, die Sekretion eines proinflammatorischen Zytokinprofils sowie die Zytotoxizität und nehmen regulatorisch Einfluss auf die Balance von TH1/TH2-Lymphozyten in Richtung entzündungshemmender TH2-Zell-Antwort. Zudem sind sie fördernd beteiligt an der Kontrolle über regulatorische T-Zellen, die essentiell für die Immunhomöostase zur Verhinderung einer Autoimmunität sind. B-Zellen erreichen durch MSCs eine verlängerte Lebenszeit. Vergleichbar mit den T-Zellen wird auch die Bildung immunsuppressiver regulatorischer B-Zellen induziert, die repräsentativ für eine immunologische Toleranz sind. Darüber hinaus zeigt sich eine vermehrte Polarisation von Monozyten bzw. Makrophagen in einen antiinflammatorischen Phänotyp (Typ 2).

Von Bedeutung ist dabei die unterschiedliche Immunmodulation abhängig von der lokalen Mikroumgebung und der Krankheitssituation des Individuums. Demzufolge zeigt sich unter entzündlichen Bedingungen eine Veränderung in der Genexpression von MSCs und deren Zell-Zell-Interaktion mit dem Resultat einer gesteigerten reaktiven Immunsuppression (Gao, et al., 2016) (Weiss & Dahlke, 2019). Unter pathologischen oralen Bedingungen können MSCs eine antiinflammatorische Funktion einnehmen und den Knochenverlust abmildern, indem unter anderem die Serum-Spiegel proinflammatorischer Zytokine gesenkt werden (Zhou, Liu, Wu, Sun, Dörfer, & Fawzy El-Sayed, 2020).

Eine in vitro durchgeführte Studie untersuchte das Potenzial von G-MSCs in der Therapie einer Hyperlipidämie-assoziierten Parodontitis. Die Auswirkungen wurden in einer Co-Kultur mit zuvor durch oxLDL stimulierte Makrophagen beurteilt. Anhand der Ergebnisse ließ sich schlussfolgern, dass M1-Makrophagen, die charakterisiert werden durch einen proinflammatorischen Phänotyp, in ihrer Aktivität durch G-MSCs gehemmt werden.

Ebenso wird die Entzündungsreaktion im Körper gesenkt, was sich unter anderem an der reduzierten Konzentration von TNF- α und IL-6 belegen lässt. Außerdem greifen G-MSCs regulierend in den Lipidmetabolismus ein. Dabei kommt es zu einer signifikanten Abnahme von Triglyceriden, Gesamtcholesterin, LDL sowie einem Anstieg von HDL. Die G-MSCs sind abschließend in der Lage, die osteogene Regeneration des parodontalen Gewebes im Mausmodell zu fördern (Hong, et al., 2019) (Liu, et al., 2020) (Yunna, Mengru, Lei, & Weidong, 2020).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen von oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) auf das charakteristische Differenzierungs- und Proliferationsverhalten von humanen gingivalen mesenchymalen Stammzellen (G-MSCs) im Vergleich zur Zytokin-induzierten Inflammation zu beschreiben. In Anbetracht des angenommenen Zusammenhangs zwischen der Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose (Nazir, 2017) (Sanz, et al., 2020), war die Hypothese dieser Studie, dass oxLDL modulierend Einfluss auf das Regenerationspotenzial der Stammzellen nehmen könnte. OxLDL würde auf diese Weise eine molekularbiologische Erklärung für die Assoziation der beiden Krankheitsentitäten darstellen. Fundamentale Bedeutung hat dabei die Möglichkeit, gingivale mesenchymale Stammzellen als vielversprechende Therapieoption in der Behandlung entzündlich parodontaler Erkrankungen einzusetzen (Nuñez, Vignoletti, Caffesse, & Sanz, 2019). Erhöhte Konzentrationen von oxLDL, die unter anderem in atherosklerotischen Läsionen vorkommen, könnten negative Effekte auf die therapeutischen Möglichkeiten im Rahmen der Stammzelltherapie haben. Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine Behandlung und Senkung des oxLDL-Spiegels zu einer Verbesserung einer Atherosklerose und einer parodontalen Entzündung führt. Das oxLDL repräsentiert wiederum eine Metaflammation. Damit wäre die aktuelle Studie ein weiterer Beleg für die systemischen Auswirkungen einer metabolischen Inflammation auf die Stoffwechsel- und Immunhomöostase im Gesamtorganismus (Eisenstecken, Gostner, Fuchs, & Überall, 2012).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovision HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Easypet Pipette Dispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometer MACS Quant®X	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Inkubator, Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Light Cycler	Roche Life Science, Prenzberg, Deutschland
Lineares Gewebereinbettssystem TPC15	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Microm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraffineinbettssystem TES 99	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Paraffinstreckbad	Medax, Neumünster, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipette 0,1–2,5µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 20-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotamax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sartorius AC210S Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spiegelreflexkamera	Canon, Tokio, Japan
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vacusaft Comfort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Vakuklav 24	Melag, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Zentrifuge 5417 R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge 5810 R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Bezugsquelle
6-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
12-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
24-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Hard Shell Platte	Roche, Mannheim, Deutschland
Bio Cassette	Bio Optica, Mailand, Italien
Bio Pads	Bio Optica, Mailand, Italien
Biosphere Quality Tips (10µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100-1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Cell-Strainer	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen (50ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Membranfilterpapier	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Microtome Blade	PFM Medical, Köln, Deutschland
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Röhren (5ml) für FACS	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (10ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zahnärztliche Pinzetten	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland

Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien

Tabelle 3 Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Adipogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Accutase	Biochrom, Berlin, Deutschland
Alcianblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alizarinrot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin	BioWest, Nuaille, Frankreich
Aqua Dest	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland
Bovin Serum Albumin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Chondrogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS-Puffer	PBS, 0,5-1,0% BSA, 0,1% Sodium Acid
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl, Chlorwasserstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Human Interleukin-1 β (IL-1 β)	PreproTech GmbH, Rocky Hill, New Jersey
Human Interferon- γ (IFN- γ)	PreproTech GmbH, Rocky Hill, New Jersey
Isopropanol (99%)	Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland
Kernechtrot	Waldeck, Münster, Deutschland

Kristallviolettffärbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
MACS-Puffer	PBS, 0,5mM EDTA, 0,5% BSA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaOH, Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Osteogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
oxLDL	Thermo Fisher, Invitrogen, Bremen, Deutschland
Paraffin	McCormick, Sparks, USA
Parafilm	Bemis, Neenah, Wisconsin
Paraformaldehyd-Pulver	SERVA, Heidelberg, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Rekombinant human TNF- α	PreproTech GmbH, Rocky Hill, New Jersey
Xylol	Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland

2.1.4 CD-Antigene und -Antikörper

Tabelle 4 CD-Antigene und -Antikörper

Antigen/Antikörper	Bezugsquelle
anti-human APC CD45	BioLegend, San Diego, USA
anti-human FITC CD14	BioLegend, San Diego, USA
anti-human FITC CD105	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD34	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD73	BioLegend, San Diego, USA
anti-human FITC CD90	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD146	BioLegend, San Diego, USA
IgG2aAPC, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
IgM PE	BioLegend, San Diego, USA

Mouse IgG1aPE, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG2aPE, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human REA FITC + PE, IgG1, Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
STRO-1 PE	BioLegend, San Diego, USA

2.1.5 Fertige Reaktionssysteme

Tabelle 5 Fertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Bezugsquelle
BD Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
MACS Cell Separation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Protect Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.6 Primer

Tabelle 6 Primer

Primer	Identifikationsnr. Roche	von	Hersteller
ACAN H.sapiens	ENST00000439576	Roche, Deutschland	Mannheim,
ALP H.sapiens	ENST00000374840	Roche, Deutschland	Mannheim,
LPL H.sapiens	ENST00000311322	Roche, Deutschland	Mannheim,
NANOG H.sapiens	ENST00000229307	Roche, Deutschland	Mannheim,
OCT-4 H.sapiens	ENST00000259915	Roche, Deutschland	Mannheim,
PGK1 H. sapiens	ENST00000373316	Roche, Deutschland	Mannheim,
RUNX2 H.sapiens	ENST00000359524	Roche, Deutschland	Mannheim,
SOX-2 H.sapiens	ENST00000325404	Roche, Deutschland	Mannheim,
SPARC H.sapiens	ENST00000231061	Roche, Deutschland	Mannheim,

2.1.7 Sterilisationsverfahren

Alle nicht sterilverpackten Materialien wurden mit dem Vakuklav 24 (Melag, Berlin, Deutschland) bei 134°C und 2 bar für dreieinhalb Minuten sterilisiert.

2.2 Zustimmung der Ethikkommission und informierte Einwilligung

Die aktuelle Studie wurde von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (D 513/17) genehmigt. Der übergreifende Studienplan umfasst die in-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf gingivale mesenchymale Stammzellen. Zunächst wurde von jedem Patienten die informierte Einverständniserklärung eingeholt, bevor die erforderlichen gingivalen Probeexzisionen stattfanden.

2.3 Stammzell-Isolation und Kultivierung

Im Anschluss an die informierte Zustimmung der Patienten in die Behandlung konnten in einem chirurgischen Eingriff in der Klinik für Oralchirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gesunde, teilweise impaktierte dritte Molaren mit freien gingivalen Weichgewebekragern gewonnen werden. Im Rahmen der Aufarbeitung erfolgte die Entfernung des freien Gingivakragens, unter Vergrößerung eine Deepithelisierung und die Auftrennung in kleine Stücke (ca. 2 mm x 2 mm). In einem Basismedium bestehend aus Eagle's minimum essential medium alpha modification (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland), ergänzt mit Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1 % Amphotericin (BioWest, Nuaille, Frankreich), wurden die erhaltenen Stücke mehrmals gewaschen und in trockene 75 ml Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt, damit sie am Boden der Flaschen anhaften. Das Basismedium, welches nach 30 Minuten langsam den Kulturflaschen hinzugefügt wurde, ist zusammengesetzt aus Eagle's minimum essential medium alpha modification ergänzt mit 15 % fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 400 mmol/ml L-Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 % Amphotericin. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxid-Gehalt (CO₂) im Brutschrank HERAcCell (Thermo Scientific, Waltham, USA), um die Zellen bis zu einer 80%igen Konfluenz wachsen zu lassen. Mittels Phasenkontrast-Inversmikroskopie (Zeiss Axiovert 40C von Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und unter Zuhilfenahme der Mikroskopsoftware Axiovision HRC (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) fand periodisch eine Kontrolle statt. Das Basismedium wurde innerhalb einer Woche drei Mal ausgetauscht.

Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte im Labor unter sorgfältigen Hygienemaßnahmen unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Thermo Scientific, Waltham, USA), die mit einem Absaugsystem und angeschlossener Vakuumpumpe Vacusafe Comfort (IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz) verbunden war.

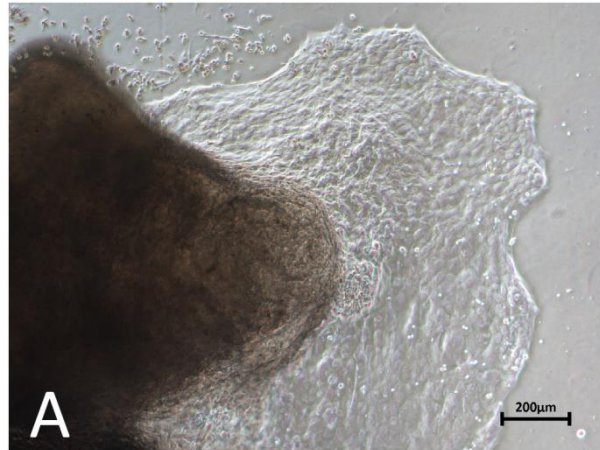


Abbildung 8 Gingiva-Probe und wachsendes Mischgewebe

Das Bild zeigt eine mikroskopische Aufnahme einer Gingiva-Probe mit wachsendem Mischgewebe.

Basismedium

- Eagle's minimum essential medium alpha modification
- 15 % fetalem Kälberserum (FCS)
- 400 mmol/ml L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 1 % Amphotericin

2.4 Passagieren von G-MSCs

Nach dem Wachstum der Zellen bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80-85 % wurden die Stammzellen subkultiviert und zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS Dulbecco, Phosphate buffered saline) (Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen am Boden der Kulturflaschen wurden 10 ml im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnte Accutase (Biochrom, Berlin, Deutschland) zugegeben und die Kulturflaschen über einen Zeitraum von vier Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nachdem eine Überführung des Mediums mit den enthaltenen Zellen in sterile konische Falcon Polypropylen-Röhrchen mit einem Volumen von 50 ml (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) erfolgte, wurden die Röhrchen bei 2000 rpm für 10 Minuten in der Zentrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, wobei der entstandene Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden in 2 ml des Basismediums resuspendiert. Zum Auszählen der Zellen wurden 10 µl der entstandenen Suspension auf eine Neubauerzählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert und auf Lebensfähigkeit mittels Trypanblau (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) getestet. Mit einer Dichte von 30 Zellen/cm² wurden die Zellen in 10 ml Basismedium in 75-ml-Kulturflaschen zum erneuten Kultivieren ausgesät. Der Inkubator, in den die Kulturflaschen für das weitere Anhaften und Wachstum gelegt wurden, bleibt eingestellt auf 5 % CO₂ und auf 37°C temperiert. Gewechselt wurde das Kulturmedium drei Mal pro Woche.

2.5 Magnetic activated cell sorting (MACS)

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-85 % der Zellen in der ersten Passage wurde eine immunomagnetische Zellsortierung zur Isolierung der G-MSCs eingesetzt. Verwendung fanden dafür der für Stammzellen charakteristische anti-STRO-1-Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) und anti-IgM MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben und dem MACS Cell Separation Kit (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

Die Zellzahl wurde zunächst in einer mit 70%igem Ethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) desinfizierten Neubauerzählkammer bestimmt. Für jeden Patienten wurde ein separates Falcon Röhrchen genutzt, dem pro 1×10^7 Zellen je 20 µl anti-STRO-1 und anti-IgM MicroBeads-Lösung zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 Minuten im Kühlschrank bei 4°C gekühlt, bevor die 20-fache Menge (entsprechend 2 ml) PBS in die Falcon Röhrchen hinzu pipettiert wurde (Pipette 100-1000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Waschvorgang mit PBS wurde im Anschluss an das Zentrifugieren bei 1700 rpm und 37°C für 10 Minuten wiederholt. Das verbliebene Zellpellet wurde in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Der ebenfalls mit 70%igem Alkohol desinfizierte MACS-Multistand wurde unter die mikrobiologische Sicherheitsbank Hera Safe (Thermo Scientific, Waltham, USA) gestellt und die MACS-Säule mit dem dazugehörigen Filter daran befestigt. Mit Hilfe des MACS-Puffer (PBS, 0,5 mM EDTA, 0,5 % Bovines Serumalbumin (BSA)) wurde die Säule zunächst gespült und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen.

Stufenweise wurde die Zellsuspension in je 500 µl-Mengen in den Filter pipettiert, danach drei Mal mit 500 µl MACS-Puffer gespült und die durchlaufende Flüssigkeit in einem neuen Falcon Röhrchen aufgefangen. Die auf diese Weise erhaltenen MACS-negativen Zellen wurden nach der Zentrifugation bei 1700 rpm für 10 Minuten und Absaugen des Überstandes in Basismedium resuspendiert. Mittels Pipette wurde die Suspension in Zellkulturflaschen überführt und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert. Im Anschluss wurde außerhalb des Magnetfeldes die Säule in einem Nachbarraum unter sterilen Gegebenheiten mit 1 ml MACS-Puffer gefüllt. Die Flüssigkeit ließ sich mit einem Stempel in ein neues Falcon Röhrchen drücken, wodurch MACS-positive Zellen isoliert von MACS-negativen Zellen gewonnen wurden. Diese wurden wie die MACS-negative Zellfraktion zentrifugiert, resuspendiert und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Das Basismedium wurde im Folgenden drei Mal pro Woche gewechselt (Abbildung 9).

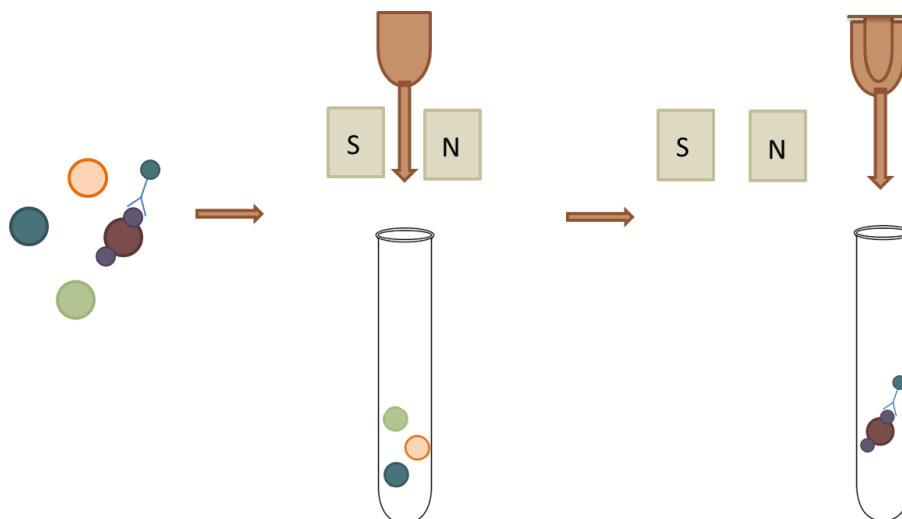


Abbildung 9 Positiv-Selektion mit MACS® Technologie

Dargestellt ist das Prinzip der positiven Selektion. Die gesuchten Zellen werden über ein Oberflächenprotein magnetisch markiert. Während der Elution im Magnetfeld werden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, wohingegen die übrigen Zellen ausgewaschen werden. Außerhalb des Magnetfeldes kann die gesuchte markierte Zelllinie anschließend eluiert werden.

(modifiziert nach: Magnetic cell separation strategies with MACS® Technology, <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/macs-cell-separation/macs-cell-separation-strategies.html>, 31.12.2020)

2.6 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Quantifizierung der MACS-positiven-Zellen wurden die Proben der zweiten Passage im Durchflusszytometer MACS Quant® X (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) in Abhängigkeit von ihrer Größe und Granularität charakterisiert. Nach Erreichen der Konfluenz von 60-80 % wurden die Proben zunächst für die Färbung vorbereitet. Dazu wurde der Zelllayer nach dem Absaugen des Mediums zwei Mal gründlich mit PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 10 % Accutase (Biochrom, Berlin, Deutschland) vom Boden der Flaschen gelöst. Das Enzym wurde dafür in PBS verdünnt.

Nachdem die Zellen im Brutschrank inkubiert wurden, erfolgte die Filtration durch einen Cell-Strainer (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen. Die überführte Suspension wurde bei 1700 rpm und einer Temperatur von 23°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Resuspension der Zellen erfolgte nach Absaugen des Überstandes in 700 µl PBS. Nachdem die Falcon-Röhrchen vorsichtig auf dem Vortex Genie 2 (Bender & Holbein AG, Bruchsal, Deutschland) durchmischt wurden, fand eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur statt, wobei darauf geachtet wurde, dass kein Licht an die Proben gelang. Im Anschluss wurde je 1 µl MACS-Puffer hinzugefügt und die Suspensionen erneut bei 1700 rpm und 23°C zentrifugiert. Für die folgende Färbung wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 900 µl PBS resuspendiert. Dazu wurden jeweils 450 µl FCS pipettiert, bevor eine gleichmäßige Verteilung auf neun FACS-Röhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) erfolgte. Im Anschluss wurden Antikörper zugesetzt, die spezifisch für CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 und CD146 (alle von BioLegend, San Diego, USA) sind. Die weitere Inkubation der Röhrchen fand für 30 Minuten bei 4°C und wie zuvor in Dunkelheit statt.

Für die sich anschließende sorgfältige Waschung wurden jeweils 1 ml PBS zugefügt, die Lösungen für 10 Minuten bei 1700 rpm und 4°C zentrifugiert sowie der pro Durchlauf entstandene Überstand abgekippt. Dieser Prozess wurde im Folgenden erneut durchgeführt und das gebildete Pellet daraufhin in 150 µl Paraformaldehyd mit einer Konzentration von 4 % fixiert. Die Proben wurden gekühlt bei 4°C gelagert. Im Anschluss an die Messung der Proben erfolgte mithilfe des MACS Quant® X Flow Cytometer die Auswertung mit der Software MACS Quantify™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und Flow Jo_v10.7.2 (Becton, Dickinson & Company, Heidelberg, Deutschland) zur Analyse der durchflusszytometrischen Daten (Fawzy El-Sayed, et al., 2015), (Gressner & Arndt, 2019).

2.7 Gruppenaufbau

Die zweite Passage der MACS-positiven G-MSCs wurde im Zusammenhang mit den folgenden Versuchen in differenten Medien kultiviert, wobei drei Mal pro Woche das Medium gewechselt wurde.

In der Kontrollgruppe (control) wurden die Zellen mit Basismedium behandelt, welches sich zusammensetzt aus:

- Eagle's minimum essential medium alpha modification (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- 15 % fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- 400 mmol/ml L-Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz)
- 100 U/ml Penicillin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- 1 % Amphotericin (BioWest, Nuaille, Frankreich)

Dem Basismedium in der Entzündungsgruppe (infl.) wurden proinflammatorische Zytokine hinzugefügt, die unter anderem im Rahmen einer Parodontitis beobachtet werden können:

- 1 ng/ml Interleukin-1 β (IL-1 β) (PreproTech GmbH, Rocky Hill, New Jersey)
- 10 ng/ml Tumornekrosefaktor α (TNF- α) (PreproTech GmbH, Rocky Hill, New Jersey)
- 100 ng/ml Interferon- γ (IFN- γ) (PreproTech GmbH, Rocky Hill, New Jersey)

Die dritte Gruppe ist definiert als metabolische Entzündungsgruppe (oxLDL), in der 200 µl (mit einer Konzentration $c = 2,5$ mg/ml) oxLDL zu 10 ml Basismedium zugegeben wurde:

- 50 µg/ml oxLDL (Thermo Fisher, Invitrogen, Bremen, Deutschland)

Tabelle 7 Gruppenaufbau: Vergleich der Nährmedien

Basismedium (M1)	Entzündungsmedium (EM)	oxLDL
<ul style="list-style-type: none"> • Eagle's minimum essential medium alpha modification • 15 % fetalem Kälberserum • 400 mmol/ml L-Glutamin • 100 U/ml Penicillin • 100 µg/ml Streptomycin • 1 % Amphotericin 	<ul style="list-style-type: none"> • Basismedium • 1 ng/ml Interleukin-1β • 10 ng/ml Tumornekrosefaktor α • 100 ng/ml Interferon-γ 	<ul style="list-style-type: none"> • Basismedium • 50 µg/ml oxLDL

2.8 Multilinen Differenzierungspotenzial

Ausgangspunkt der Differenzierung sind die G-MSCs, welche mit den oben beschriebenen drei Nährmedien für eine Woche vorbehandelt wurden. Im Folgenden werden die Vorgehensweisen der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung eingehend beschrieben.

2.8.1 Osteogene Differenzierung

Im Kontext der Zelldifferenzierung wurden die G-MSCs der zweiten Passage in 12-Well-Platten (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät, wobei eine Dichte von 2×10^4 Zellen/ Well gewählt wurde. Im Anschluss an die Zelladhäsion und die einwöchige Stimulation erfolgte die osteogene Differenzierung durch den Zusatz von osteogenem Induktionsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland), welches drei Mal pro Woche ausgetauscht wurde. Verglichen wurden dabei Zellen, die in Übereinstimmung mit dem Gruppenaufbau zuvor mit Basismedium (control), Entzündungsmedium (infl.) bzw. mit dem metabolischen Entzündungsmedium (oxLDL) für eine Woche stimuliert wurden sowie eine Kontrolle, die weiterhin über zwei Wochen mit Basismedium behandelt wurde. Nach einem Zeitraum von 14 Tagen wurde eine Färbung mit Alizarinrot (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zur Beurteilung der Verkalkung der extrazellulären Matrix durchgeführt.

2.8.1.1 Alizarinrot Färbung

Unter Anwendung der Alizarinrot-Färbung wurde die osteogene Differenzierung sichtbar gemacht. Die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen unter anderem Decorin, Kollagen und Osteocalcin findet in weit entwickelten Osteoblasten bzw. in terminal differenzierten Osteozyten statt. Die Einlagerung von Calciumphosphat in die extrazellulären Matrixproteine wurde mit Alizarinrot nachgewiesen. Zur Herstellung der benötigten Alizarinrot-Lösung wurden 40 ml destilliertes Wasser (H_2O) (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland) zu 500 mg Alizarinrot S (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) addiert, wobei der pH-Wert mit dem pH-Meter (WTW, Weilheim, Deutschland) optimal im sauren Bereich bei etwa 4,1 mit Natriumhydroxid (NaOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland) bzw. mit Chlorwasserstoff (HCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland) adjustiert wurde. Die finale Konzentration beträgt etwa 40 mM.

Alizarinrot Lösung (pH = 4,0)

500 mg Alizarinrot S (Molekulargewicht (MW): 342,26 g/mol)

40 ml destilliertes H₂O

auf pH 4,1 einstellen

Endkonzentration

~ 40 mM

Für die Färbung der osteogen differenzierten Zellen wurde das entsprechende Medium zunächst aus den Wells abgeschüttet und unter Sorgfalt mit 1 ml/ Well PBS gewaschen. Nach Abschütten des PBS wurde mit 99,8 % Ethanol für einige Minuten fixiert und nachfolgend wieder abgenommen. Durch Hinzugabe der Alizarinrot-Lösung wurde die Verkalkung sichtbar gemacht. Dafür wurden die Platten vorsichtig 10 Minuten geschwenkt, die Lösung abgekippt und im Anschluss die Wells drei Mal mit Leitungswasser gewaschen. Unter Zuhilfenahme einer Spiegelreflexkamera (Canon, Tokio, Japan) wurde das makroskopische Bild der osteogenen Differenzierung fotografisch dokumentiert. Bei Raumtemperatur wurden die Platten zum Trocknen gelagert.

2.8.1.2 Quantitative Analyse der Alizarinrot Färbung

Im ersten Schritt der quantitativen Analyse wurden 400 µl Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) zu jeder Kavität der 12-Well-Platte hinzugefügt und die Zellen unter leichter Rotation für 30 Minuten inkubiert, damit sich der Monolayer leicht mittels Zellscraper (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) vom Boden lösen lässt. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und anschließend kräftig für 30 Sekunden mittels Vortex gemischt. Während des Erhitzens auf 85°C für 10 Minuten auf dem Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde das Mikrozentrifugen-Röhrchen mit einem Parafilm (Bemis, Neenah, Wisconsin) verschlossen, um ein Verdampfen zu vermeiden. Die Röhrchen wurden daraufhin für fünf Minuten in Eis gestellt, wobei diese bis zum vollständigen Erkalten nicht geöffnet und im Folgenden bei 14.000 rpm für 15 Minuten in der Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert wurden.

Während des Vorgangs wurde die Alizarinrot-Standard-Kurve angefertigt. Die erstellte Standardkurve dient dazu, jedem gemessenen Extinktionswert eine bestimmte Konzentration Alizarinrot zuzuordnen. Die Extinktion des ersten Standards, bei dem die Messgröße Alizarinrot nicht vorhanden ist und demzufolge null ist, repräsentiert den Blindwert der weiteren Messung. Unter Zuhilfenahme der Software Microsoft Excel erfolgte die graphische Darstellung der Extinktion gegenüber der Konzentration.

Nach Beenden der Zentrifugation wurden 200 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert. Durch Zugabe von etwa 75 µl 10 % Ammoniumhydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde der pH-Wert neutralisiert und durch Messen eines Aliquots gewährleistet, dass sich der pH-Wert im Bereich von 4,1 bis 4,5 befindet. In eine lichtundurchsichtige 96-Well-Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) mit transparentem Boden wurde eine Verdünnungsreihe aus 100 µl RNase freiem Wasser und 100 µl der Alizarinrot-Lösung geplottet sowie ein Aliquot jeder Probe bzw. des Standards hinzu pipettiert. Die optische Dichte (OD)-Messung erfolgte im Anschluss bei 405 nm.

2.8.2 Adipogene Differenzierung

Mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ Well wurden die G-MSCs der zweiten Passage in 12-Well-Kulturplatten verteilt. Nachdem die Zellen adhärirten und wie im Gruppenaufbau beschrieben eine Woche vorstimuliert wurden, wurde mit adipogenem Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) die Differenzierung induziert. Zu diesem adipogenem Differenzierungsmedium wurde je 1 ml Amphotericin, Penicillin/ Streptomycin und Glutamin addiert. Ein Wechsel des Mediums fand drei Mal pro Woche über 21 Tage statt. Zum Identifizieren von vorhandenen Lipidtropfen in den Zellen wurde mit Oil Red O (Sigma Aldrich, München, Deutschland) gefärbt. Neben den drei Gruppen wurden zum Vergleich Stammzellen, die kein Induktionsmedium erhielten, sondern mit Basismedium behandelt wurden, herangezogen.

2.8.2.1 Oil Red O Färbung

Bei Oil Red O handelt es sich um einen fettlöslichen Farbstoff, welcher charakteristisch neutrale Lipide in kultivierten Zellen und in der Spongiosa sichtbar macht. Zur Herstellung einer 0,5 % Oil Red O-Stammlösung wurden 500 mg Oil Red O in 100 ml einer 99 %igen Isopropanol-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) über einen Zeitraum von vier Stunden vorsichtig vermischt. Die Arbeitslösung setzt sich zusammen aus sechs Teilen der Oil Red O-Stocklösung und vier Teilen destilliertem Wasser, die nach 24 Stunden bzw. vor jedem Gebrauch durch ein Membranfilterpapier (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert wurde.

Oil Red O-Stocklösung

500 mg Oil Red O (MW: 408,51 g/mol)

100 ml 99 % Isopropanol

Für 4 Stunden vermischen

Oil Red O-Gebrauchslösung

60 ml Oil Red O-Stocklösung

40 ml destilliertes Wasser

Nach 24 Stunden filtrieren

Zunächst wurde zum Fixieren des Zell-Monolayer eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung hergestellt. Dazu wurden 0,8 g Paraformaldehyd-Pulver (SERVA, Heidelberg, Deutschland) mit Hilfe einer Sartorius AC210S Waage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) abgemessen, mit 20 ml PBS vermengt und auf maximal 60°C aufgekocht. Unter Rühren wurde tropfenweise NaOH-Lösung hinzugegeben, sodass der pH einen Wert von 7,2 annahm. Das Medium, mit dem die Zellen bedeckt waren, wurde abgekippt und die Wells einmal gründlich mit PBS gewaschen.

Die gut trocken geschüttelten Zellrasen in den Wells wurden daran anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit der 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. In Folge dessen wurde zum Waschen des Zellrasens kurz destilliertes Wasser addiert, bevor für fünf Minuten 60 % Isopropanol hinzugefügt wurde. Zum Erhalten einer 60%igen Lösung wurden 33 ml 99 % Isopropanol mit 17 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Die abschließende Färbung der Wells erfolgte bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit je 1 ml der Oil Red O-Arbeitslösung. Nach 15 Minuten Schüttelinkubation wurde drei Mal mit je 1 ml destilliertem Wasser gewaschen. Auf diese Weise waren die intensiv orangerot angefärbten Fettvakuolen gut unter dem Mikroskop identifizierbar und wurden zur Dokumentation mit der Mikroskopkamera fotografiert.

2.8.2.2 Quantitative Analyse der Oil Red O Färbung

Der Oil Red O-Farbstoff wurde mittels Zusatz von 1 ml Isopropanol pro Well eluiert, wobei die Inkubation für 15 Minuten unter rotierender Bewegung auf dem Orbitalschüttler Rotamax (Heidolph, Schwabach, Deutschland) stattfand. Für die Auswertung wurden von jeder Probe 100 µl entnommen und in eine 96-Well-Platte transferiert. Die Extinktion und dementsprechend die OD wurde bei 540 nm gemessen. Die Extinktion von Wells, in denen laut Protokoll keine Zellen vorhanden waren, wurden als Leerwerte genutzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die zuvor kein adipogenes Induktionsmedium erhielten. Nachträglich wurde der Leerwert von der Extinktion der Kontrollen und Testproben subtrahiert. Zur Auswertung der adipogenen Differenzierung wurde ebenfalls eine Standardkurve für Oil Red O angefertigt.

2.8.3 Chondrogene Differenzierung

Für die Induktion der chondrogenen Differenzierung wurden die G-MSCs der zweiten Passage als 3D-Mikromasse mit einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/ Röhrrchen in 1,5 ml Eppendorf-Röhrrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) kultiviert. Gegenübergestellt wurden die drei stimulierten Gruppen des Projektaufbaus mit anschließender Behandlung in chondrogenem Induktionsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) sowie eine Kontrolle, die weiterhin mit Basismedium genährt wurde. Über sechs Wochen wurde drei Mal innerhalb einer Woche das Medium gewechselt. Die Bildung von Glykosaminoglykanen in den geschnittenen 3D-Mikromassen wurde nach 42 Tagen mit Hilfe einer Alcianblau-Färbung (Sigma Aldrich, München, Deutschland) und Kernechtrot-Gegenfärbung (Waldeck, Münster, Deutschland) beurteilt.

2.8.3.1 Paraffinschnitte von Zellpellets

Die chondrogenen Zellpräparate wurden zunächst in einem Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)/ Formaldehydgemisch (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

Fixiermittel

10 ml Glutaraldehyd 25 %

4 ml Formaldehyd 37 %

Mit Phosphatpuffer auf 100 ml und pH 7,4 auffüllen

Nach einem dreimaligen Waschgang mit PBS, um das Medium auszuspülen, wurde Fixiermittel in die Eppendorf-Röhrrchen pipettiert. Im Kühlschrank wurden die Zellen für zwei Stunden gekühlt. Durch die Zugabe von PBS wurde das Fixiermittel danach ausgewaschen, wofür der Vorgang für fünf Durchläufe wiederholt wurde. In diesem Zustand können die Zellen im Kühlschrank wochenlang überdauern. Für die Vorbereitung der Paraffineinbettung wurden die Proben in eine Kasette (Bio Optica, Mailand, Italien) mit zwei Schaumstoffdeckchen, sogenannten Bio pads (Bio Optica, Mailand, Italien), eingelegt, in die zudem ein Kartonstreifen mit der Präparat-Nummer und dem Jahr beigefügt wurde. In der Zwischenzeit wurden die Proben in 70 % Ethanol gelagert bis das Programm des linearen Gewebereinbettungssystems TPC15 (Meditate Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) die Entwässerung begann. Nach 24 Stunden beendet der Automat den Prozess in flüssigem Paraffin bei einer Temperatur von 60°C.

Nachfolgend an die Entnahme der Kapseln aus dem Automaten wurden die Schaumstoffdeckchen mit Sorgfalt auseinandergenommen und das gelbliche Pellet mithilfe einer Präpariernadel in ein Edelstahlwännchen eingelegt. Nach erneuter Auflage der Einbettform ohne Deckel wurde das Wännchen mit flüssigem Paraffin (McCormick, Sparks, USA) befüllt und so das Pellet überschichtet. Die Präparat-Nummer wurde beigelegt und das Wännchen auf einer Kühlplatte des Paraffineinbettsystems TES 99 (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) ausgekühlt. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden im Kühlschrank gelagert. Zum Schneiden der Blöcke wurde ein Schlittenmikrotom (Microm HM 430 von Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet. Das Edelstahlwännchen wurde zum Säubern in Xylol (Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland) eingelegt.

Abhängig von der Wahl der richtigen Mikrotomklingen (PFM Medical, Köln, Deutschland) und der optimalen Temperatur des Paraffins können die besten Schnittergebnisse erzeugt werden. Zuvor auf eine Kühlplatte gestellte Messingwürfel wurden auf die Paraffinblöcke gelegt, um das Abkühlen zu beschleunigen. Mit dem Ziel überflüssiges Wachs zu entfernen, wurden die einzelnen Blöcke zunächst auf eine Schnittdicke von 10-15 µm angeschnitten. Auf diese Weise wurde zudem die Schnittebene korrigiert. Bei Erreichen der interessierten Zellebene wurde nach Wechsel auf ein neues Messer auf eine Dicke von 4-5 µm heruntergeschnitten. Im idealen Fall wurde eine aneinanderhängende Serie von etwa vier Präparaten geschnitten, die mit einer Pinzette (Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Wanne transferiert wurde. Wenn ausreichend viele Schnitte vorlagen, wurden diese mit einer Präpariernadel oder einem feinen Pinsel auf einen Superfrost Ultra Plus Objektträger (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) gelenkt, welcher anschließend entsprechend beschriftet und vorsichtig senkrecht zurück in die Wanne gestellt wurde.

Aufgrund von Adhäsionskräften war es möglich, die Schnitte aus dem Wasser zu ziehen und in ein Wasserbad bzw. Paraffinstreckbad (Medax, Neumünster, Deutschland) zu überführen. Diese wurde zuvor auf 50°C erwärmt. Durch den Vorgang wurden kleine Fältchen in den Präparaten entfernt. Nach dem Glätten wurden die Schnitte erneut an die Objektträger von unten nach oben angeklebt. Während des anschließenden Färbeprozesses verhinderte eine Beschichtung des Glases ein Lösen der Schnitte. Unter dem Mikroskop wurde unmittelbar kontrolliert, ob die korrekten Präparat-Ebenen geschnitten wurden. Nachdem die Objektträger bei 37°C im Inkubator getrocknet wurden, erfolgte die spezifische Färbung für die chondrogene Differenzierung.

2.8.3.2 Alcianblau-Kernechtrot Färbung

Histologisch wurden die Schnitte anschließend zum Nachweis der chondrogenen Eigenschaft mit 1 % Alcianblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 3 % Essigsäure gefärbt. Dadurch wurden saure Mucopolysaccharide und sulfatierte Glykosaminoglykane nachgewiesen. Als Gegenfärbung wurde Kernechtrot (Waldeck, Münster, Deutschland) zum Kontrastieren der Zellkerne verwendet. Alcianblau-Färbelösung lässt sich aus 1 g abgewogenem Alcianblau und 3 ml Essigsäure sowie 97 ml Wasser herstellen.

Alcianblau-Färbelösung:

1 g Alcianblau (MW: 1298.86 g/mol)

3 ml Essigsäure

97 ml Wasser

Zunächst wurden die Zellschnitte für 30 Minuten mit Alcianblau gefärbt. Nachdem verbliebene Farbreste abgeschüttet und mit Leitungswasser abgespült wurden, erfolgte für fünf Minuten die Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung. Das Abwaschen überschüssiger Farbe durch Leitungswasser wurde zwei Mal wiederholt. Das Ergebnis der chondrogenen Färbung wurde zuletzt fotografisch unter dem Mikroskop dokumentiert.

2.8.3.3 Densitometrische Auswertung – Automated digital image quantification

Die Intensität der angefärbten chondrogen differenzierten Präparate erfolgte mit der Software ImageJ. Bei ImageJ handelt es sich um ein Java-basiertes Bildverarbeitungsprogramm, das an den National Institutes of Health (NIH) und dem Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin) entwickelt wurde.

ImageJ ermöglicht es, die dargestellten Schnittbilder nach Subtraktion des Hintergrundes in eine Pixelzahl umzurechnen. Dabei wurde sowohl die Totale Pixelzahl ausgegeben, als auch separat die durch Alcianblau bzw. Kernechtrot angefärbten Pixel berechnet und die Ergebnisse mit dem Programm Microsoft Excel gespeichert. Mithilfe des Mikroskops wurden die Bilder bei minimaler Belichtung und einer Belichtungszeit von 8,49 ms aufgenommen. Damit die Präparate im Ganzen dargestellt werden konnten, wurde die kleinste Vergrößerung am Mikroskop eingestellt und die Objektträger mit den Schnitten im Zentrum positioniert. Aufgrund der nicht exakt gleichförmigen Beleuchtung des Brenners wurde die Kamera kontinuierlich gerade ausgerichtet.

Nur zu Beginn der Fotografie wurde ein Weißabgleich durchgeführt, damit die Einstellungen für alle Bilder identisch sind. Die Software ImageJ wurde im Anschluss verwendet, um die exportierten Bilder, zu analysieren. Gemessen wurden unter Anwendung der Funktion Colour Threshold die folgenden Werte:

	Hue	Saturation	Brightness
Total Pixel/ Schnitt	0-255 (Pass ✓)	16-255 (Pass ✓)	0-254 (Pass ✓)
Alcianblau/ Schnitt	96-193 (Pass ✓)	16-255 (Pass ✓)	0-254 (Pass ✓)
Kernechtrot/ Schnitt	34-194 (Pass -)	16-255 (Pass ✓)	0-254 (Pass ✓)

Die entsprechenden Bereiche wurden für jeden Schnitt maskiert, über die Funktion „Select“ markiert und die Pixel gemessen. Für die Auswertung wurden die relativ durch Alcianblau und Kernechtrot angefärbten Pixel berechnet, indem durch die Totalen Pixel dividiert wurde.

2.9 Colony Forming Unit (CFU)

G-MSCs der zweiten Passage wurden zum Nachweis ihrer Effizienz, typische Kolonien zu bilden, mit einer Dichte von $1,5 \times 10^3$ Zellen/ Well ausgesät. In Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zu einer der drei Gruppen wurden die Zellen entsprechend in Basismedium, EntzündungsmEDIUM oder in Nährmedium, welches um oxLDL ergänzt wurde, kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die Kulturen zwei Mal mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 2 ml eiskaltem Ethanol 10 Minuten fixiert. Die Kristallviolett-Lösung zum Anfärben der Kolonien wurde durch Auflösen von 0,3 g Kristallviolett-Pulver in 10 ml destilliertem Wasser zubereitet.

Kristallviolett-Lösung

0,3 g Kristallviolett-Pulver (MW: 407,99 g/mol)
10 ml destilliertes Wasser

Nach Herstellung der Lösung wurden je 2 ml in die Kavitäten pipettiert und die Zellkolonien mit der Farbe bedeckt. Für 10 Minuten wurden die Zellen inkubiert, bevor zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und überschüssige Farbe eliminiert wurde. Nachdem die Präparate getrocknet waren, wurden Fotografien angefertigt. Aggregate von mindestens 50 Zellen wurden dabei als Kolonie gewertet. Die Zählung erfolgte durch fünf unabhängige Beobachter.

2.10 Zellproliferationskurven

Zur Erstellung einer Wachstumskurve für die G-MSCs wurden Zellen der zweiten Passage in 24-Well-Platten (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) mit einer Dichte von 1500 Zellen/ Well ausgesät und gemäß der oben beschriebenen Gruppenzuordnung kultiviert. Der Zeitpunkt, an dem die Adhäsion stattfand, wurde als Tag 0 definiert. Die Kulturplatten wurden im Brutschrank bei 5 % CO₂ und bei 37°C inkubiert, wobei täglich über zwei Wochen für jede Gruppe die Zellzahl bestimmt wurde. Nachdem das jeweilige Medium abgesaugt wurde, erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS, um Verunreinigungen zu eliminieren. 1 ml verdünnte Accutase (Biochrom, Berlin, Deutschland), welche im Verhältnis 1:10 mit PBS vermischt wurde, wurde im Folgenden in die Vertiefungen pipettiert, damit die Stammzellen enzymatisch gelöst wurden. Im Anschluss an die vierminütige Inkubation im Brutschrank wurden die Zellsuspensionen in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt, wobei 10 µl davon auf eine Neubauerzählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop die Zellzahl ausgezählt wurde. Die Ergebnisse der drei Gruppen wurden gegenübergestellt und tabellarisch sowie grafisch in einem Diagramm mit Microsoft Excel dargestellt.

2.11 Gen-Expressionsprofil

Eine Gensequenzierung wurde zum einen im Rahmen der Multilinen-Differenzierung spezifisch für die osteogene, adipogene und chondrogene Entwicklung und zum anderen zur Evaluation der Veränderung der Stammzell-Marker im Verlauf durchgeführt. Gemäß der obigen Beschreibung bezüglich der Differenzierung (siehe 3.8) wurden die G-MSCs ausgesät, über den jeweiligen Zeitraum in den entsprechenden Medien kultiviert und nach zwei (osteogene Differenzierung), drei (adipogene Differenzierung) bzw. sechs (chondrogene Differenzierung) Wochen anstelle der jeweiligen Färbung eine RNA-Extraktion durchgeführt.

Das Wachstum einer weiteren Stammzellpopulation der zweiten Passage wurde separat über sieben Tage in 6-Well-Platten beobachtet. Als Nährmedium wurden Basismedium, Entzündungsmittel und metabolisches Entzündungsmittel mit oxLDL verwendet, wobei drei Mal pro Woche das Medium ausgetauscht wurde. An den Tagen eins, drei, fünf und sieben erfolgte eine RNA-Extraktion mit dem Ziel, Änderungen in stammzellcharakteristischen Transkriptionsfaktoren zu detektieren.

2.11.1 RNA Extraktion

Das gemäß der Anweisung verwendete RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) ermöglicht die Aufreinigung von Ribonukleinsäure (RNA, ribonucleic acid) aus kleinen Mengen Ausgangsmaterial. Die gereinigte RNA ist zum Beispiel konzipiert für die Verwendung in der Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) und in der komplementären DNA (cDNA, complementary DNA)-Synthese (Abbildung 10).

Vor Beginn der ersten Nutzung des Kits wurde der RPE-Puffer mit 96-100 % Ethanol angesetzt. Demgegenüber wurde der RLT-Puffer vor jeder Extraktion frisch aus 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und der Pufferlösung hergestellt. Diese wurden im Verhältnis 10 µl 2-Mercaptoethanol zu 1 ml RLT-Pufferlösung vermengt.

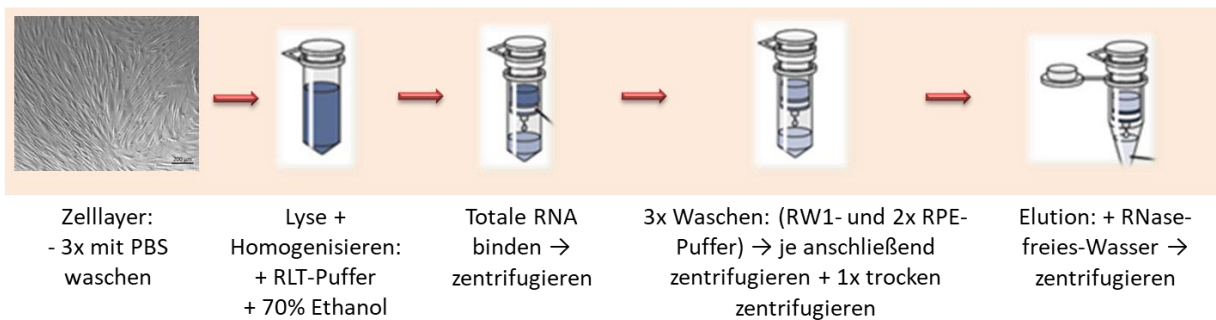


Abbildung 10 RNA-Extraktion mittels RNeasy® Mini Kit
(modifiziert nach: Qiagen, RNeasy® Mini Handbook, Oktober 2019,
https://www.google.com/search?q=rneasy+mini+procedure&client=firefox-b-d&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKewiOg9LP-lfuAhXHYMAKHRgiCLYQ_AUoAXoECACQAw#imgrc=kYO_nxc6z2X3QM)

Für die 6-Well-Platten wurden 300 µl/ Well und für die 12-Well-Platten 200 µl/ Well fertiger RLT-Puffer benötigt, der stark denaturierendes Guanidin-Thiocyanat für die Lyse und Homogenisierung der biologischen Proben enthält. Das die Zellen bedeckende Medium wurde zunächst abgekippt und die Wells drei Mal gründlich mit PBS gespült. Nachdem auch dieses verworfen wurde, wurden 300 µl bzw. 200 µl des neu angesetzten RLT-Puffers auf die Zellen pipettiert und diese mittels Zellschaber vom Boden gelöst bis die Flüssigkeit visköser wurde. In gleicher Menge wie RLT-Puffer wurde 70 % Ethanol addiert und gegebenenfalls erneut mit dem Zellschaber die Zellen gelöst. Das gut durchgemischte Zell-Lysat wurde anschließend mit Hilfe einer Pipette in beschriftete RNeasy Mini Spin-Säulen überführt, welche in 2 ml Sammelröhrchen gestellt wurden. RNA-Moleküle mit einer Länge über 200 Nukleotiden binden selektiv an die Membran, sodass Verunreinigungen effizient entfernt wurden.

Die Proben wurden für 30 Sekunden bei 10.000 rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das anfallende Eluat wurde in gesondertem Abfall für 2-Mercaptoethanol entsorgt. Im weiteren Prozess wurde 700 µl RW1-Puffer auf die Säulen pipettiert, erneut für 30 Sekunden bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Eluat entsorgt. Anschließend wurden 500 µl des mit Ethanol angesetzten RPE-Puffers auf die Säulen gegeben. Beim Zentrifugieren bleiben die Einstellungen einprogrammiert mit 30 Sekunden bei 10.000 rpm und 4°C. Dieser Vorgang wurde danach ein zweites Mal wiederholt und das jeweils entstandene Eluat abgekippt.

Abschließend wurden die Zellen trocken ohne Zugabe von Puffer-Lösung 30 Sekunden bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der obere Anteil der Spin-Säulen wurde in neue beschriftete 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gestellt. Direkt auf die Membran der Säulen wurde danach 25 µl RNase-freies-Wasser pipettiert und nach wenigen Minuten der Zentrifugiervorgang für eine Minute bei 10.000 rpm gestartet, um die RNA zu eluieren. Die Proben wurden bei -70°C in den beschrifteten Eppendorf-Röhrchen eingefroren.

2.11.2 Reverse Transkription

Bevor die interessierten Gensequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) amplifiziert wurden, wurde die gewonnene RNA im Rahmen der Reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Bei den dabei benötigten Enzymen handelt es sich um reverse Transkriptasen, welche RNA-abhängig komplementäre DNA-Einzelstränge synthetisieren (Thiemann, Cullen, & Klein, 2015).

Verwendet wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), welches eine effiziente reverse Transkription und effektive Eliminierung genomischer DNA (gDNA, genomic deoxyribonucleic acid) bietet. Für den ersten Schritt, die Eliminierung der gDNA, wurde die aufgereinigte 12 µl RNA-Probe mit 2 µl gDNA-Wipeout-Puffer vermengt und bei 42°C für zwei Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben unmittelbar auf Eis gelagert. Der zweite Schritt ist die Reverse Transkription. Dafür wurde zunächst ein sogenannter Master-Mix aus Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT-Puffer und RT-Primer-Mix hergestellt.

Master-Mix für eine 12 µl RNA-Probe:

- 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase
- 4 µl Quantiscript RT-Puffer
- 1 µl RT-Primer-Mix

6 µl des ebenfalls auf Eis gelagerten Master-Mix wurden danach zu jeder RNA-Probe pipettiert. Während der Inkubation für 15 Minuten bei 42°C erfolgte die Transkription. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch Erwärmen auf Temperaturen von 95°C für drei Minuten beendet. Die produzierten cDNA-Templates wurden im Folgenden für die Real-time-PCR-Analyse (rtPCR, Echtzeit-PCR) verwendet (Abbildung 11).



Abbildung 11 Reverse Transkription mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit
(modifiziert nach: Qiagen, QuantiTect® Reverse Transcription, Handbook, März 2019)

2.11.3 Real-time Polymerase Chain Reaction (rtPCR)

2.11.3.1 Grundprinzip der PCR

Die PCR ermöglicht es, gezielt eine spezifische DNA-Sequenz auf vorbestimmte Weise zu kopieren und zu modifizieren. Eine häufige Anwendung der PCR ist die Untersuchung von Mustern der Genexpression. Die PCR nutzt das DNA-Polymerase-Enzym, welches physiologisch die Synthese von DNA-Sequenzen katalysiert. Alle DNA-Polymerasen synthetisieren DNA in 5'-3'-Richtung. Um den Syntheseprozess zu starten, ist es notwendig ein Paar chemisch synthetisierter Oligonukleotidprimer aus DNA herzustellen. Diese beiden Primer sind so konzipiert, dass sie das DNA-Fragment flankieren.

Eine Standard-PCR erfordert vier Komponenten:

- DNA-Template-Molekül, aus dem das Fragment amplifiziert wird
- Zwei synthetische Primer
- Synthetische Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)
- DNA-Polymerase-Enzym

Bei hohen Temperaturen von etwa 95°C denaturiert das DNA-Template-Molekül. Die beiden Stränge bewegen sich auseinander und brechen die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Doppelhelix-DNA-Stränge verbinden. Bei niedrigeren Temperaturen von 50-68°C wird dann der Primer an die DNA angelagert, was als Annealing bezeichnet wird. Bei optimaler Temperatur tritt eine Verlängerung, das bedeutet eine Extension ein, und die DNA-Polymerase synthetisiert die DNA beginnend im Bereich des Primers. Nach einer gewissen Zeit abhängig von der Syntheserate der DNA-Polymerase wird die PCR-Lösung erneut auf Denaturierungstemperaturen erhitzt, um den vorherigen Zyklus mehrmals zu wiederholen. Mit jedem PCR-Zyklus nimmt das PCR-Produkt, als Amplikon definiert, exponentiell zu (Abbildung 12).

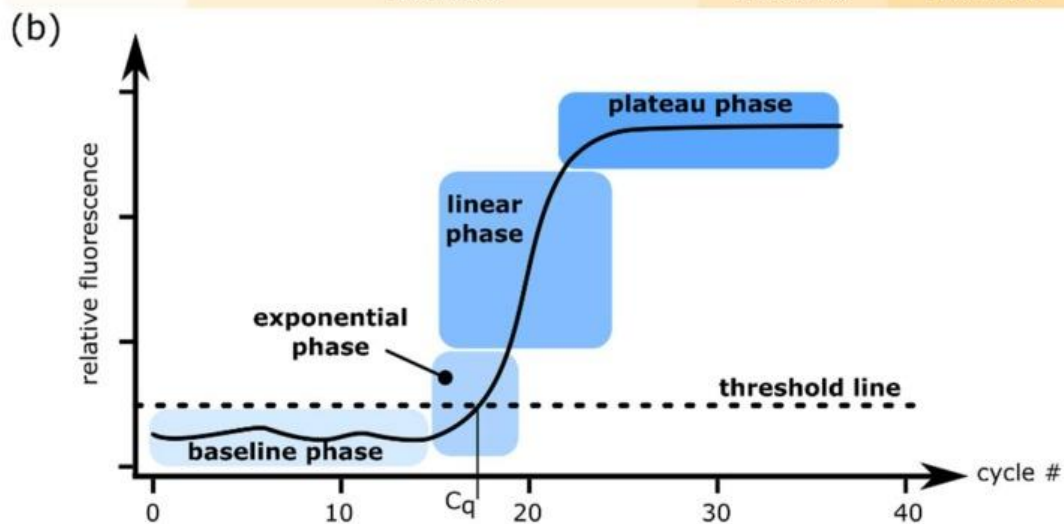
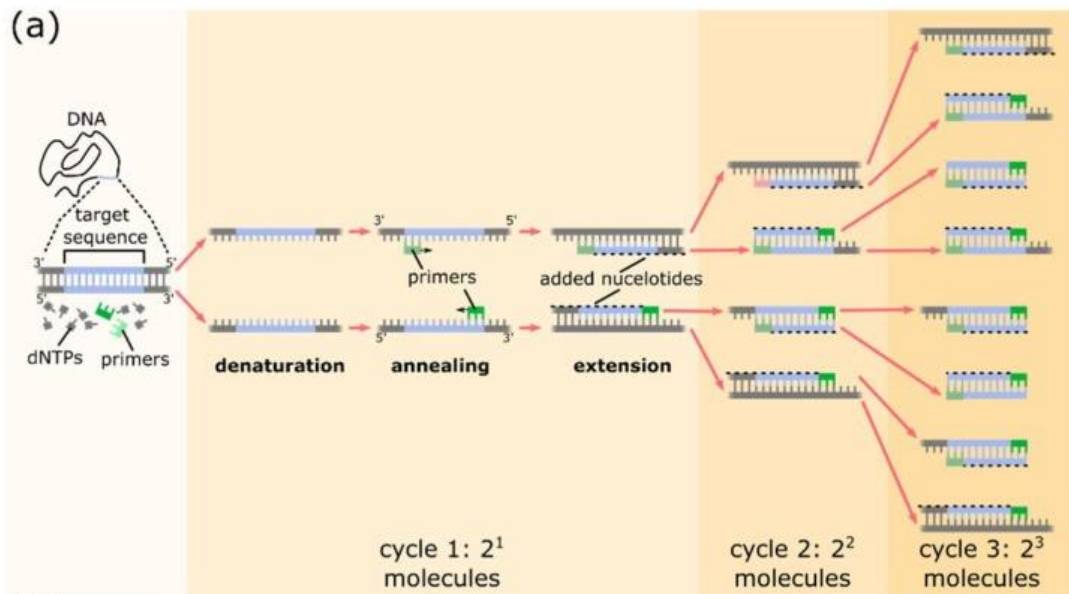


Abbildung 12 Prinzipien der Polymerase Chain Reaction (PCR)

- (a) Ein PCR-Zyklus beinhaltet die drei Schritte: 1. Denaturierung der DNA-Doppelhelix durch Hitze, 2. Annealing der Primer an den komplementären DNA-Bereich und 3. Extension der Zielsequenz durch die DNA-Polymerase.
- (b) Bei Darstellung des Amplikons auf einer linearen Skala während einer real-time PCR (rtPCR) zeigt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf. In anfänglichen Zyklen der PCR verbleibt das Fluoreszenzsignal des Produktes im Hintergrund. Die Einstellung der Basislinie wird derart gewählt, dass dieses Fluoreszenzsignal eliminiert wird. Die exponentielle Phase wird unter optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt durch eine Verdopplung des Amplikons während jedes Zyklus, wobei der Schwellenwert oberhalb des Hintergrundsignals normiert wird. C_q markiert die Zykluszahl, bei der es zu einer Kreuzung der Schwellenwert-Linie durch die Amplifikationskurve kommt. Das Signal in der linearen Phase nimmt nicht mehr exponentiell zu, da die Reagenzien nicht uneingeschränkt vorhanden sind. Während der Plateau-Phase wird ein maximales Fluoreszenzsignal erreicht. Aufgrund der verbrauchten Reagenzien findet keine weitere Produktion zusätzlicher DNA-Sequenzen statt.

(Quelle: dPCR: A Technology Review; P.-L. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes; *Sensors (Basel)*, Vol. 18, No. 4, Seite 1271, April 2018)

2.11.3.2 Real-time Polymerase chain reaction (rtPCR)

Quantitative PCR-Methoden ermöglichen es, die Akkumulation von DNA-Produkten während jeder Runde der PCR-Amplifikation zu messen. Dafür werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die entweder an doppelsträngige DNA oder an fluoreszenzmarkierte Sonden, die spezifisch für die gesuchte DNA-Sequenz sind, binden. Zu den quantitativen PCR-Methoden zählt unter anderem die rtPCR.

Somit ist die Menge der Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte und erlaubt die Quantifizierung des Amplikons während jedes Zyklus. Für die rtPCR wurde der LightCycler® (Roche Life Science, Prenzlberg, Deutschland) verwendet, welcher die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz in einer Probe während der Temperaturzyklen einer PCR ermöglicht. Am Gerät wurden vor Beginn der Messung die Einstellungen gespeichert:

Tabelle 8 Programmierung der PCR-Zyklen am LightCycler®

Schritt	Zeit/ Zyklen	Temperatur
Initiale Aktivierung	600 Sekunden	95°C
1. Denaturierung	10 Sekunden	95°C
2. Annealing	10 Sekunden	60°C
3. Extension	10 Sekunden	72°C
Ende der PCR, abkühlen	30 Sekunden	37°C

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde das Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) eingesetzt. Sämtliche zu untersuchende Proben wurden im Verhältnis 1:2 verdünnt, das heißt es wurden explizit 20 µl jeder Probe mit 40 µl RNase/ DNase freiem Wasser vermengt. Die 96-Well-Hard Shell Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) wurde entsprechend markiert und beschriftet. Außerdem wurden die Primer, welche den gesuchten Bereich flankieren, angesetzt. Das Phosphoglyceratkinase-1-Gen (PGK1) codiert für ein Enzym, das ubiquitär zytoplasmatisch und nukleär exprimiert wird und demzufolge als positive Kontrolle für alle PCR-Messungen verwendet wurde. In Bezug auf die osteogene Differenzierung wurden Primer für die charakterisierenden Gene Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), Osteonectin (SPARC, auch englisch Secreted protein acidic and rich in cystein) und Alkaline phosphatase (ALP) eingesetzt. In Gebrauch genommen für die adipogene Differenzierung wurden zusätzlich die Primer des Gens der Lipoproteinlipase (LPL) und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-γ (PPARγ) sowie Aggrecan (ACAN) für die chondrogene Differenzierung.

Tabelle 9 Primer Namen und ID für real-time PCR der Differenzierung

Gen	Assay ID	Gene Symbol	Accession ID	Primer Sequenz
PGK1	102083	PGK1 H.sapiens	ENST00000373316	FWD: GGAGAACCTCCGCTTTTCAT REV: GCTGGCTCGGCTTTAACC
RUNX2	113380	RUNX2 H.sapiens	ENST00000359524	FWD: GCCTAGGCGCATTTCAGAT REV: CTGAGAGTGGGAAGGCCAGAG
SPARC	103218	SPARC H.sapiens	ENST00000231061	FWD: GGTGGAAGTAGGAGAATTTGATG REV: TGGTTCTGGCAGGGATTT
ALP	103448	ALP H.sapiens	ENST00000374840	FWD: AGAACCCCAAAGGCTTCTTC REV: CTTGGCTTTTCTTCATGGT
LPL	113230	LPL H.sapiens	ENST00000311322	FWD: TCGTTCTCAGATGCCCTACA REV: GCCTGATTGGTATGGGTTTC
PPAR γ	110607	PPAR γ H.sapiens	ENST00000287820	FWD: GACAGGAAAGACAACAGACAAATC REV: GGGGTGATGTGTTTGAACCTG
ACAN	138057	ACAN H.sapiens	ENST00000439576	FWD: GAACGACAGGACCATCGAA REV: AAAGTTGTCAGGCTGGTTGG

PGK1 = Phosphoglyceratkinase 1 Gen, RUNX2 = Runt related transcription factor 2, SPARC = Osteonectin (auch englisch Secreted protein acidic and rich in cystein), ALP = Alkaline phosphatase, LPL = Lipoproteinlipase, PPAR γ = Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ , ACAN = Aggrecan

Entscheidende Transkriptionsfaktoren, die in die Selbsterneuerung von Stammzellen involviert sind, sind die Gene des Homeobox protein NANOG (NANOG), sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX-2) und Oktamer-bindenden Transkriptionsfaktors 4 (OCT-4). Primer für die entsprechenden Gen-Sequenzen wurden daher zur Analyse veränderter Stammzell-Eigenschaften im Verlauf der unterschiedlichen Stimulation gemäß dem Gruppenaufbau eingesetzt.

Tabelle 10 Primer Namen und ID für real-time PCR der Stammzellgene

Gen	Assay ID	Gene Symbol	Accession ID	Primer Sequenz
PGK1	102083	PGK1 H.sapiens	ENST00000373316	FWD: GGAGAACCTCCGCTTTTCAT REV: GCTGGCTCGGCTTTAACC
NANOG	148147	NANOG H.sapiens	ENST00000229307	FWD: GAGATGCCTCACACGGAGAC REV: AGGGCTGTCCTGAATAAGCA
SOX-2	111867	SOX-2 H.sapiens	ENST00000325404	FWD: ATGGGTTTCGGTGGTCAAGT REV: GGAGGAAGAGGTAACCACAGG
OCT-4	113034	OCT-4 H.sapiens	ENST00000259915	FWD: GCAAACCCGGAGGAGTC REV: TCCAGGGTGATCCTCTTCT

PGK-1 = Phosphoglyceratkinase 1, NANOG = NANOG Homeobox Protein, SOX2 = sex determining region Y-box 2, OCT4 = Oktamer bindender Transkriptionsfaktor 4

Bei dem FastStart Essential DNA Green Master handelt es sich um ein Reaktionsgemisch, welches zusammengesetzt ist aus der FastStart Taq DNA-Polymerase und den für doppelsträngige DNA-spezifischen Farbstoff SYBR Green I. Der Farbstoff dient dem Nachweis der sich im Laufe der PCR-Zyklen anreichernden Amplikone. Erforderlich für die Analyse war die Zugabe von 10 µl FastStart Essential DNA Green Master, 1 µl Primer und 4 µl DNase freies Wasser zu 5 µl der verdünnten cDNA-Probe, welche in die jeweils markierten Kavitäten der 96-Well-Platte pipettiert wurden.

rtPCR-Mix für eine 5 µl verdünnte cDNA-Probe:

10 µl FastStart Essential DNA Green Master

1 µl Primer

4 µl DNase freies Wasser

Außerdem wurde zum Ausschluss einer Kontamination der PCR-Reagenzien eine No-Template-Kontrolle, die bis auf das zu vervielfältigende Template sämtliche Komponenten beinhaltet, gemessen. Darüber hinaus wurde eine No-RT-Kontrolle, bei der keine Reverse Transkription durchgeführt wurde, mit in die Genexpressionsanalyse einbezogen. Eine positive Reaktion dieser Kontrolle wäre Hinweis auf eine Kontamination durch DNA-Sequenzen.

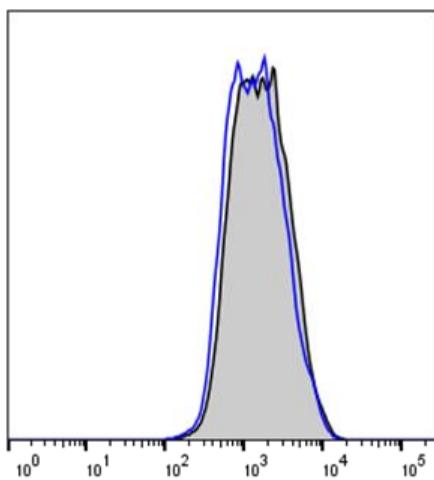
2.12 Statistische Analyse

Die Software SPSS 20.0 (IBM Corporation, New York, USA) stellte die Grundlage für die statistische Datenanalyse dar. Ermittelt wurden für quantitative Variablen die Größen Median und Interquartilenabstand. Geeignet für die Untersuchung von Differenzen zwischen den Zellzahlen und in der Genexpression waren nichtparametrische Analyseverfahren aufgrund der nicht normalverteilten Variablen und den voneinander abhängigen Stichproben. Der Friedman-Test stellt ein Verfahren zum Vergleich der Mittelwerte unter Verwendung der Ränge anstelle der tatsächlichen Werte dar. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde im Anschluss zur Ermittlung des Vorzeichens und der Größe der voneinander verschiedenen zentralen Tendenzen zweier abhängiger Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau wurde für sämtliche Berechnungen mit $\alpha=0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

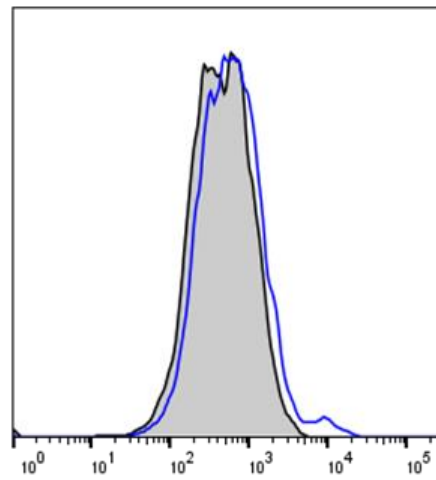
3.1 Durchflusszytometrische Analyse

Ein Merkmal zur Definition humaner MSCs ist die Expression bestimmter Oberflächenproteine. Entsprechend der obigen Versuchsbeschreibung (Abschnitt 3.6) wurde eine durchflusszytometrische Analyse der spezifischen CD-Marker für die Stammzellen durchgeführt. Zur Berechnung der „positiven“ Werte wurde die Overton-Methode auf die zytometrischen Daten angewandt. Die nach der Zellsortierung erhaltenen G-MSCs zeigten für CD14, CD34, CD45 und CD146 keine bis geringe Expressionswerte. Dem gegenüber lagen positive Expressionen für CD73, CD90 und CD105 vor (Abbildung 13).



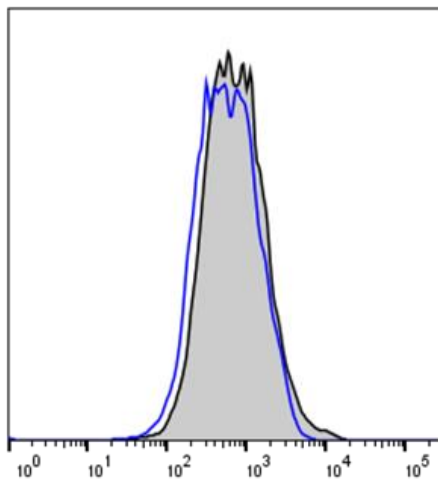
B1-A :: REA Ctrl FITC-A

(a) CD14: Overton %Positive 7,7493



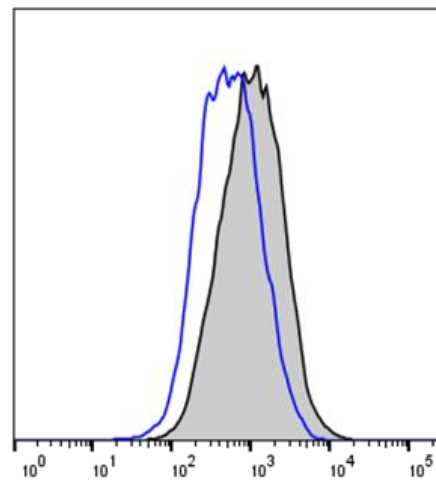
B2-A :: IgG2a-PE-A

(b) CD34: Overton %Positive 0,00



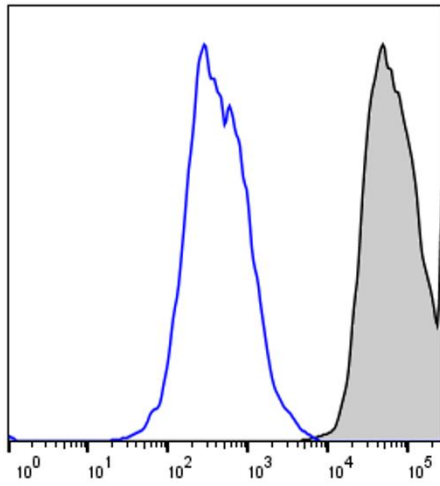
R1-A :: IgG2a-APC-A

(c) CD45: Overton %Positive 10,9320



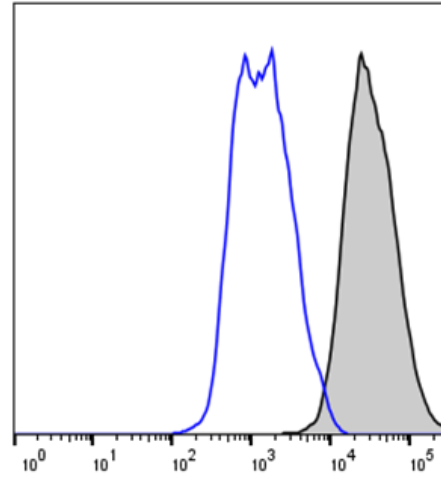
B2-A :: IgG1-PE-A

(d) CD146: Overton %Positive 29,1111



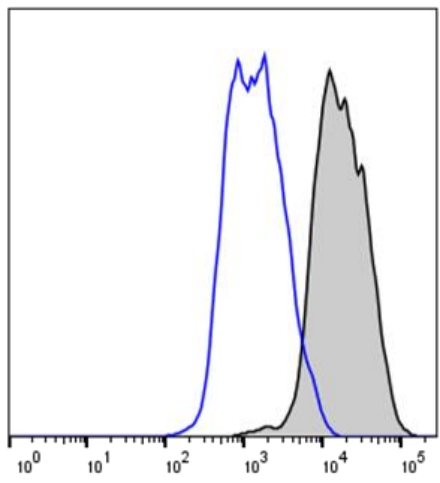
B2-A :: REA Ctrl-PE-A

(e) CD73: Overton %Positive 99,6565



B1-A :: REA Ctrl FITC-A

(f) CD90:Overton %Positive 97,0171



B1-A :: REA Ctrl FITC-A

(g) CD105: Overton %Positive 90,4363

Abbildung 13 Durchflusszytometrie: Expressionsprofil charakteristischer Oberflächenmarker der G-MSCs

CD = Cluster of differentiation, G-MSCs = gingivale mesenchymale Stammzellen

Auf der Ordinate ist die relative Zellzahl dargestellt, die Abszisse bezeichnet die Intensität der Fluoreszenz der entsprechend markierten Antikörper.

3.2 Multilinien Differenzierung

Die ausgesäten G-MSCs wiesen neben adhärentem Verhalten ebenso das Charakteristikum der Multilinien Differenzierung auf. Dabei erfolgte die Ausreifung in osteogene (Abschnitt 3.8.1.), adipogene (Abschnitt 3.8.2) und chondrogene Richtung (Abschnitt 3.8.3).

3.2.1 Osteogene Differenzierung

In allen drei Versuchsgruppen konnte eine Matrixkalzifizierung und damit der Nachweis einer Knochenbildung dargestellt werden. Bereits nach 10 Tagen Differenzierung mit osteoinduktivem Medium modellierte sich sowohl die Form der Zellen als auch deren Anordnung zueinander. Im Gegensatz zur charakteristischen Stammzelleigenschaft und dem fibroblastenähnlichen Aussehen formten sich die Zellen zu rundlicheren Osteoblasten, die in weniger geordneten Strukturen vorlagen (Abbildung 14).

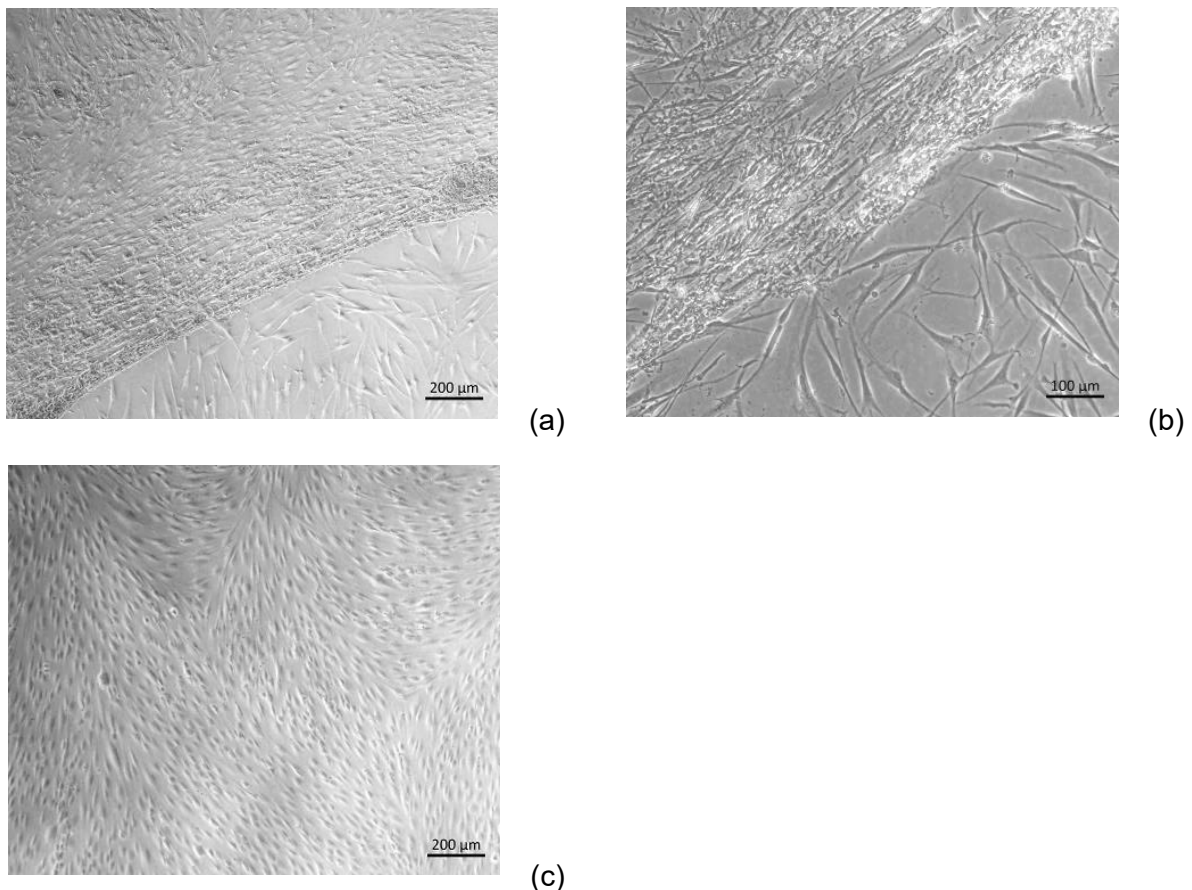


Abbildung 14 Osteogene Differenzierung am Tag 10

Mikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung nach Stimulation der gingivalen mesenchymalen Stammzellen (G-MSCs) mit oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) für eine Woche und nachfolgender Differenzierung mit osteoinduktivem Medium für 10 Tage.

(a) und (b) zeigen den Übergang der länglich, spindelförmigen Stammzellen im unteren Bildrand zu den Osteoblasten und damit der Knochenbildung.

(c) runde Osteoblasten, die weniger parallel ausgerichtet waren im Vergleich zu den G-MSCs.

Im Anschluss an die zweiwöchige osteogene Induktion konnten alle drei differenzierten Gruppen positiv mit Alizarinrot gefärbt werden, sodass eine Analyse unter Darstellung der extrazellulären Matrixkalzifizierung für die Knochenbildung erfolgte. In der Messung der optischen Dichte (OD) zeigten sich signifikante ($p=0,015$) Unterschiede im Friedman-Test, wobei sich bei Gegenüberstellung zur Kontrolle die mit Basismedium und oxLDL stimulierten Gruppen signifikant ($p=0,043$) mehr anfärbten. Dabei zeigte sich unter vorheriger Stimulation mit oxLDL die höchste Extinktion mit zudem großer Streuung, wie sich an dem Interquartilenabstand im Box-Plot widerspiegelt.

Die vergleichende Prüfung von Entzündungsmedium zum Basismedium einerseits und zum oxLDL andererseits ergab eine signifikant niedrigere Aufnahme von Alizarinrot unter inflammatorischen Bedingungen in dieser Gruppe (infl.) ($p=0,043$). Die nicht mit Differenzierungsmedium behandelte Kontrolle ist mikroskopisch weiterhin gekennzeichnet durch die Stammzellmorphologie und keine bis minimale Extinktionswerte (Abbildung 15).

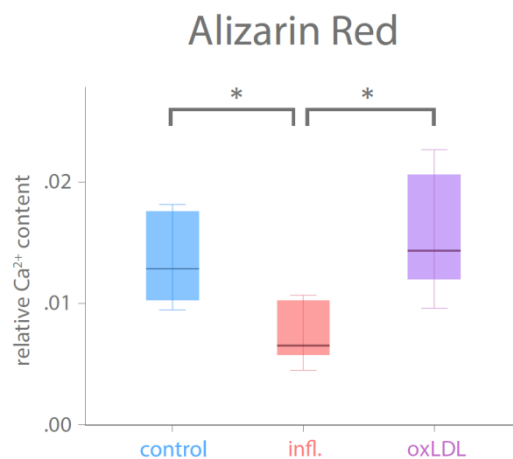
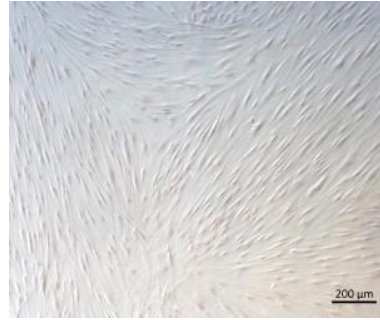


Abbildung 15 Optische Dichtemessung der osteogenen Differenzierung
control = Basismedium, infl. = Entzündungsmedium, oxLDL = oxidiertes Low Density Lipoprotein

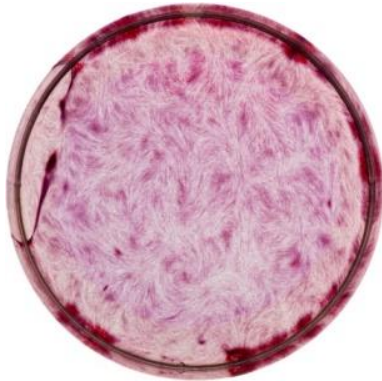
Mit einer Kamera und dem Mikroskop aufgenommene Bilder illustrierten zudem optisch die verstärkte Bildung von Knoten bzw. Knochenbälkchen in der zuvor mit Basismedium stimulierten Gruppe (control) sowie für die mit oxLDL behandelten Zellen verglichen zu den anderen Proben (Abbildung 16).



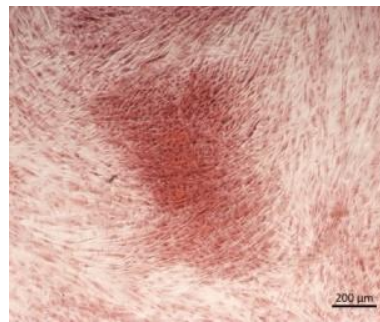
(a)



(b)



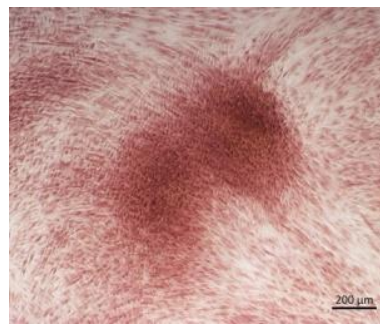
(c)



(d)



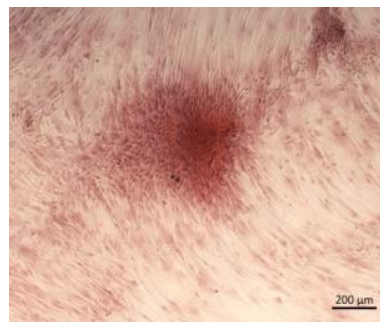
(e)



(f)



(g)



(h)

Abbildung 16 Osteogene Differenzierung

• (a) und (b) Kontrolle für drei Wochen behandelt mit Basismedium und anschließender Färbung mit Alizarinrot nach einer Woche Stimulation

• (c) und (d) mit Basismedium;

• (e) und (f) mit Entzündungsmedium;

• (g) und (h) mit oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL);

Und anschließender Differenzierung mit osteoinduktivem Medium für zwei Wochen;

Aufnahmen mit der Kamera (a,c,e,g); Mikroskopische Aufnahmen (b,d,f,h)

Die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung wurde darüber hinaus anhand der Genexpression auf Ebene der mRNA bewertet, wobei für die Knochenbildung typische Gene geprüft wurden. Im Anschluss an die RNA-Extraktion, reverse Transkription und real-time PCR zeigte die Statistik bezüglich der osteogen exprimierten Gene keine signifikanten Abweichungen zwischen den Medien für die Gene RUNX2 ($p=0,549$), ALP ($p=0,411$) und SPARC ($p=0,819$). Auffällig erschien bei Analyse der absoluten Werte jedoch tendenziell eine vermehrte Expression bei Zellen, die zuvor mit oxLDL stimuliert wurden (Abbildung 17).

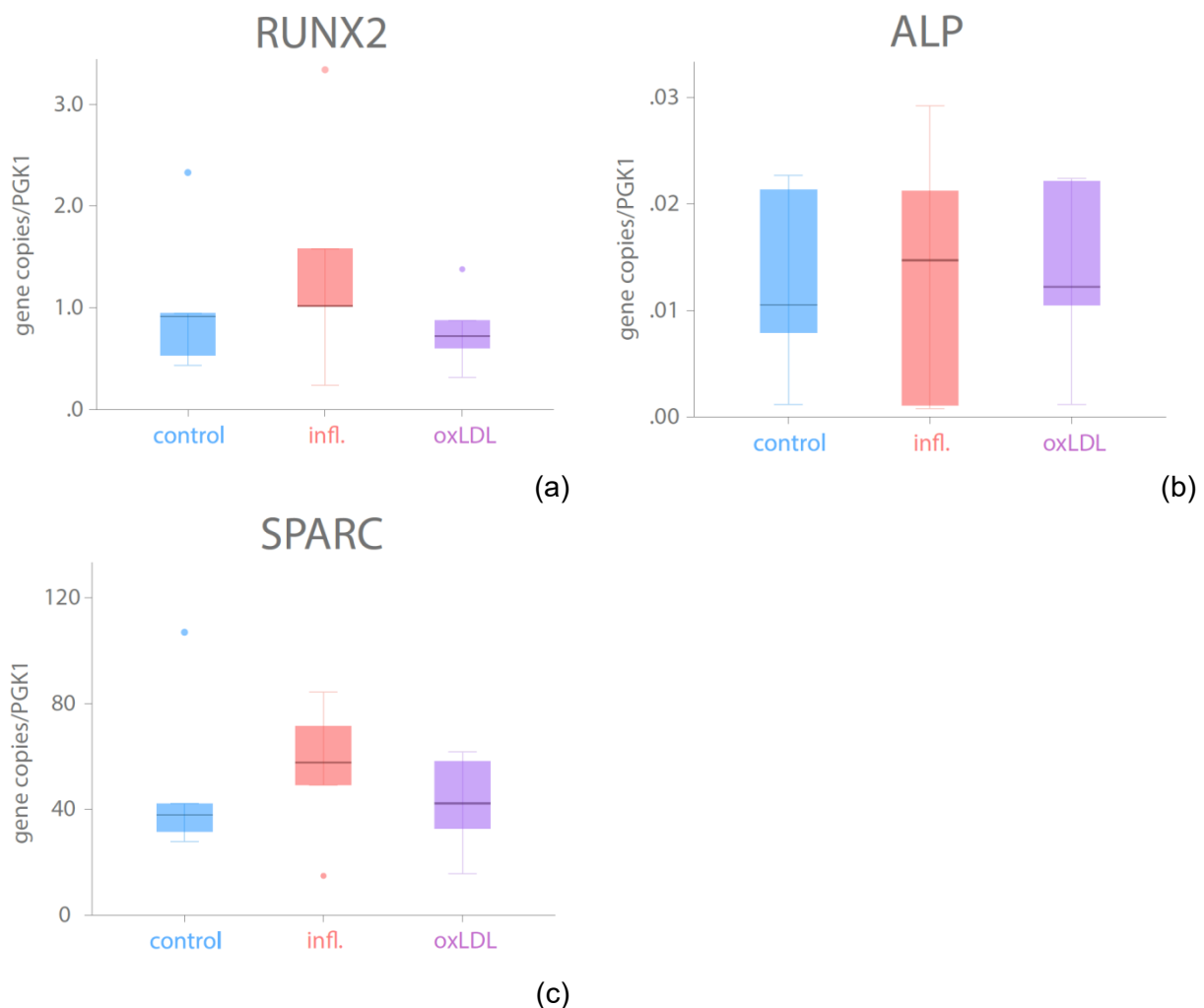


Abbildung 17 Genexpression: osteogene Differenzierung

Dargestellt ist das Genexpressionsprofil der osteogenen Differenzierung nach insgesamt drei Wochen. Eine Woche Stimulation (control = Basismedium, infl. = Entzündungsmedium, oxLDL = oxidiertes Low Density Lipoprotein). Anschließend zwei Wochen osteogene Differenzierung und RNA-Extraktion für

- (a) Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)
- (b) Alkaline phosphatase (ALP)
- (c) Osteonectin (engl. Secreted protein acidic and rich in cystein, SPARC)

3.2.2 Adipogene Differenzierung

Die Bewertung der adipogenen Differenzierung orientierte sich an der Kontrastierung basierend auf Oil Red O Färbung und der Untersuchung des Genexpressionsprofils. Beim Vergleich der drei Gruppen stellte sich morphologisch unter Betrachtung mittels Mikroskop eine nur leicht vermehrte Fetttröpfchenbildung im Entzündungsmedium heraus, wenn als Referenz die zuvor mit Basismedium stimulierten Zellen dienten. Dem gegenüber wurde die adipogene Differenzierung unter Stimulation mit oxLDL stark potenziert und es konnten verstärkt Fetttröpfchen nachgewiesen werden.

In der statistischen Auswertung waren die Unterschiede nicht signifikant im Hinblick auf die Messung der OD ($p=0,247$), wobei die geringste Extinktion im Basismedium erreicht wurde. Die inflammatorischen bzw. metainflammatorischen Medien (infl. und oxLDL) verstärkten tendenziell die Färbung durch Oil Red O und dementsprechend die adipogene Fettvakuolenbildung (Abbildung 18).

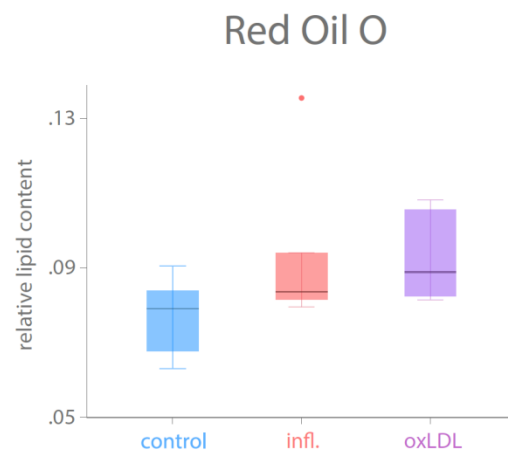
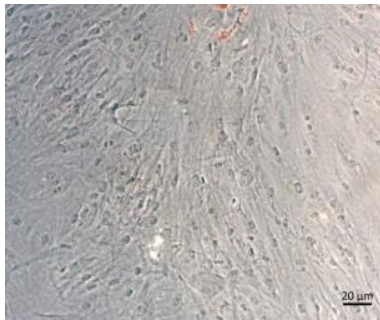


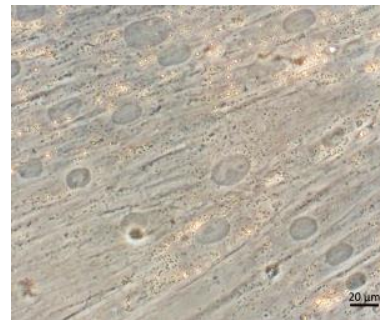
Abbildung 18 Optische Dichtemessung der adipogenen Differenzierung

control = Basismedium, infl. = Entzündungsmedium, oxLDL = oxidiertes Low Density Lipoprotein

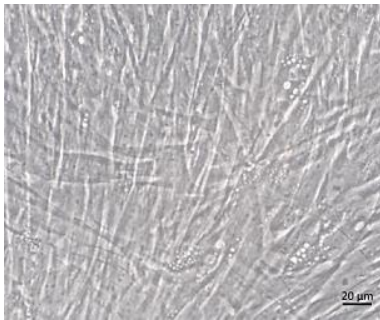
Beachtenswert war der hohe Anteil an Vakuolen mit vergleichsweise größerem Durchmesser vor der Färbung in der metabolischen Inflammations-Gruppe. Mithilfe der Oil Red O Färbung wurden viele der Vakuolen nicht angefärbt (Abbildung 19).



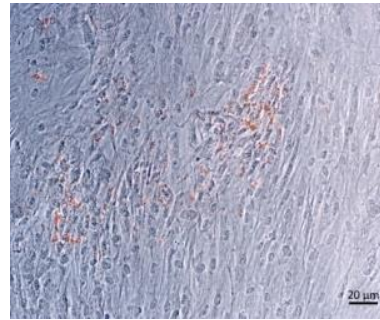
(a)



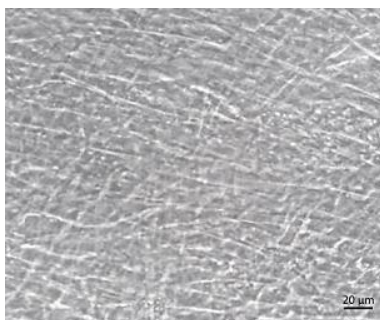
(b)



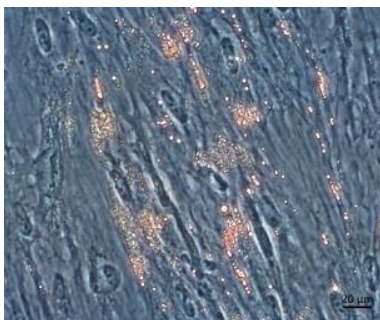
(c)



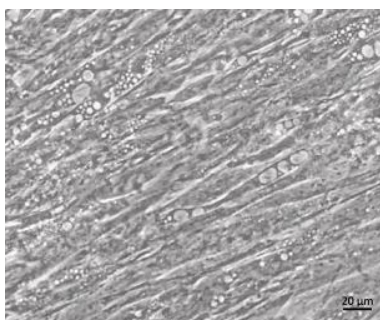
(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Abbildung 19 Adipogene Differenzierung

Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse nach dreiwöchiger Behandlung mit Differenzierungsmedium und vorheriger Stimulation für eine Woche mit

- (c) und (d) Basismedium
- (e) und (f) Entzündungsmedium
- (g) und (h) oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL).

(a) und (b) stellen Kontrollen der adipogenen Differenzierung dar, die über 3 Wochen mit Basismedium kultiviert und anschließend gefärbt wurden. Unter dem Phasenkontrastmikroskop ließ sich insbesondere nach Stimulation mit oxLDL (d) eine vermehrte Bildung von Vakuolen nachweisen.

Aufnahmen vor der Färbung mit Oil Red O (c,e,g), nach Färbung (a,b,d,f,h).

Bei Betrachtung des Genexpressionsprofil der adipogenen Differenzierung stellten sich keine signifikanten Divergenzen zwischen den Gruppen im Friedman-Test für die Lipoproteinlipase (LPL) ($p=0,074$) und den Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptor- γ (PPAR γ) ($p=0,247$) dar, wobei im Basismedium leicht erhöhte Expressionswerte für beiden Gene erreicht wurden (Abbildung 20).

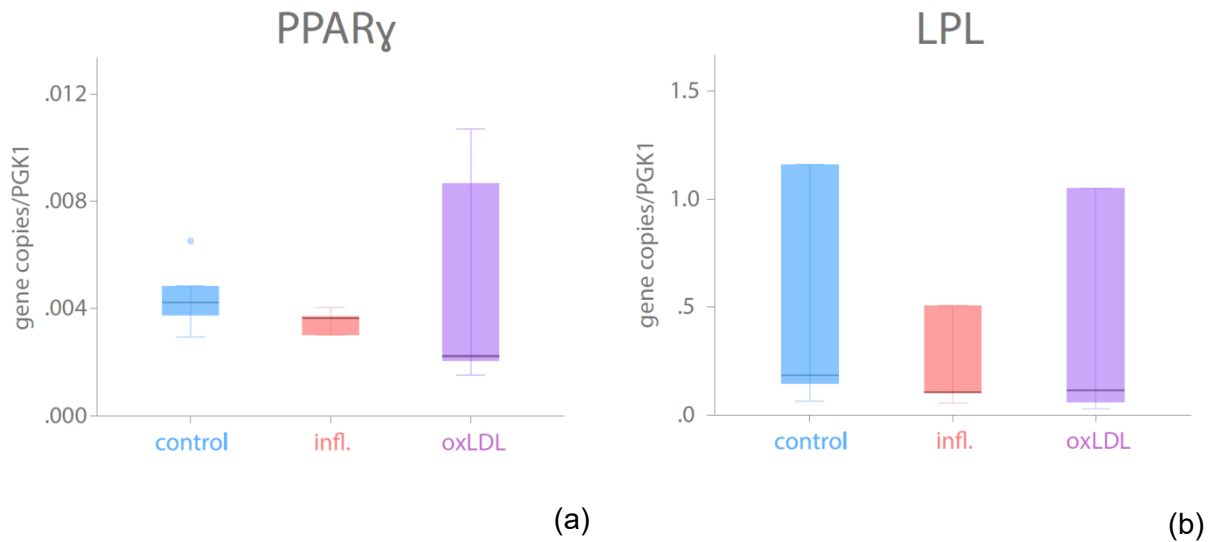


Abbildung 20 Genexpression: adipogene Differenzierung
control = Basismedium, infl. = Entzündungsmedium, oxLDL = oxidiertes Low Density Lipoprotein
(a) Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- γ (PPAR γ)
(b) Lipoproteinlipase (LPL)

3.2.3 Chondrogene Differenzierung

Auf die chondrogene Differenzierung zeigten die inflammatorischen Medien einen unterschiedlichen Einfluss. Anhand der Färbung mit Alcianblau konnte die charakteristische Struktur des Knorpelpellets im Basismedium dargestellt werden, die sich insbesondere gegenüber der Kontrolle ohne Differenzierungsmedium abgrenzte. Im Entzündungsmedium kam es zur Formation kleinerer differenzierter Pellets. OxLDL besaß hingegen die Neigung, die Differenzierung zu Knorpelzellen vergleichbar mit dem Basismedium zu fördern (Abbildung 21).

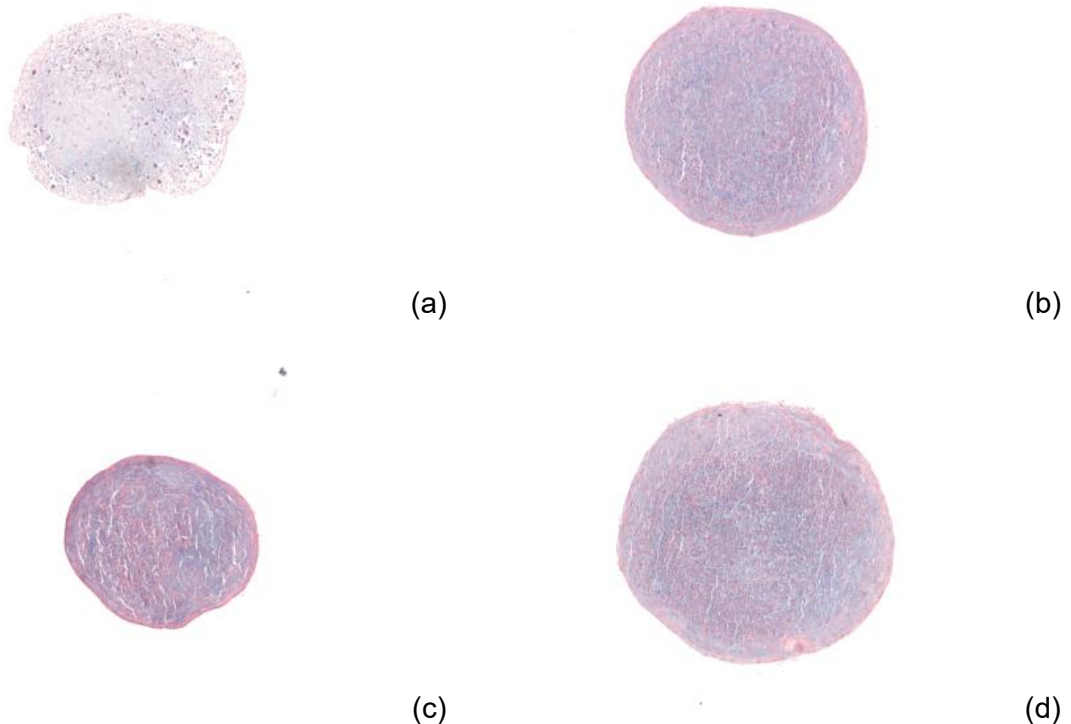


Abbildung 21 Chondrogene Differenzierung

Abgebildet sind die Schnitte der Zellpellets im Rahmen der chondrogenen Differenzierung. (a) zeigt die nicht differenzierte Kontrolle, die über sieben Wochen mit Basismedium genährt wurde. Stimuliert wurde für eine Woche mit:

- (b) Basismedium
- (c) Entzündungsmedium
- (d) oxidiertem Low density Lipoprotein (oxLDL)

und anschließend für sechs Wochen mit chondrogenem Medium differenziert.

Die digitale Quantifizierung der spezifischen Färbung einer chondrogenen Differenzierung lieferte für Alcianblau im Friedman-Test kein signifikantes Ergebnis mit einer asymptotischen Signifikanz von $p=0,247$. Die graphische Darstellung der absoluten Werte verdeutlicht allerdings, dass die höchste optische Dichte im Basismedium erreicht wurde (Median 0,54). OxLDL hemmt dabei die Differenzierung und damit die Anfärbung mit Alcianblau nur geringfügig, sodass die 50. Perzentile bei 0,32 lag im Vergleich zur zytokinvermittelten Entzündung (50. Perzentile 0,064) (Abbildung 22).



Abbildung 22 Digital image quantification der chondrogenen Differenzierung

Die Box-Plots geben die relativen Messwerte der Alcianblaufärbung an der totalen Anfärbung wieder. Verglichen wurden zuvor im Basismedium (control), Entzündungsmilieu (infl.) oder oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) beigefügtem Milieu kultivierten Zellen.

Signifikante Unterschiede ließen sich im Hinblick auf das Genexpressionsprofil nicht eruieren, wobei sich für die Aggrecan (ACAN)-Expression eine asymptotische Signifikanz im Friedman Test von $p=0,449$ errechnete. Die absoluten Werte bzw. die Ranks und der Median (M1 = 0,0027, EM = 0,0016 und oxLDL = 0,0043) deuteten auf eine höhere Expression von Aggrecan in der mit oxLDL stimulierten Zellpopulation insbesondere in Gegenüberstellung zur zytokinvermittelten Inflammation hin (Abbildung 23).

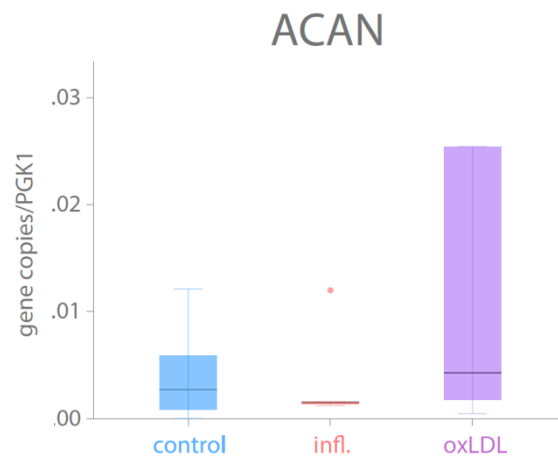


Abbildung 23 Genexpression: chondrogene Differenzierung

control = Basismedium, infl. = Entzündungsmittel, oxLDL = oxidiertes Low Density Lipoprotein
ACAN: Aggrecan

3.3 Colony Forming Unit (CFU)

Eine Kolonienbildung ließ sich nach sieben Tagen in allen drei Gruppen jedoch mit Unterschieden im Hinblick auf die Dichte und Morphologie der Zellen eruieren. Nach einer Woche zeigten die Kontrollgruppe im Basismedium und die metabolische Inflammationsgruppe eine vermehrte Kolonienbildung, die sich als signifikant im Vergleich zur Inflammationsgruppe herausstellte. Bei der parametrischen Datenauswertung ergab sich im t-Test eine Signifikanz von $p=0,002$ (Basismedium – Entzündungsmedium) und $p=0,011$ (Entzündungsmedium – oxLDL), wobei die Ergebnisse robust gegenüber einer Bonferroni-Korrektur waren (Abbildung 24).

Im Basismedium entwickelten sich dabei nach 7 Tagen gleichförmig konfigurierte Kolonien, die sich sowohl in ihrer Größe und Form ähnelten (durchschnittlich 23,08 Kolonien nach 7 Tagen) (Abbildung 25 (a) und (b)). Die zweite Gruppe, welche mit Entzündungsmedium stimuliert wurde, wies die wenigsten Kolonien auf (durchschnittlich 2,17 nach 7 Tagen). Diese waren in Umfang und Färbeverhalten verschieden. Folglich konnten kleine und größere Formationen bemessen werden, die sich durch Kristallviolette-Lösung differenzieren ließen (Abbildung 25(c) und (d)).

Die mit oxLDL behandelte Gruppe fiel durch die stärkste Kolonienformation auf (durchschnittlich 26,33 nach 7 Tagen). Charakteristisch war, wie beim zytokinvermittelten Entzündungsmedium, die uneinheitliche Größe und Färbung der angesiedelten Zellen. Wobei dieser Aspekt intensiviert in Erscheinung trat und ein Großteil der Zellen statt in Kolonien auch vereinzelt vorlag (Abbildung 25 (e) und (f)).

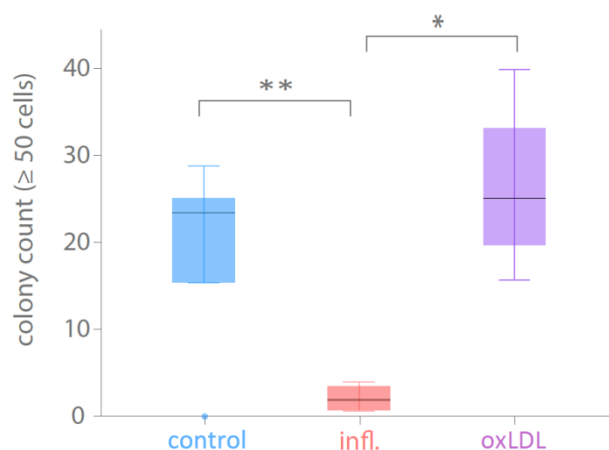
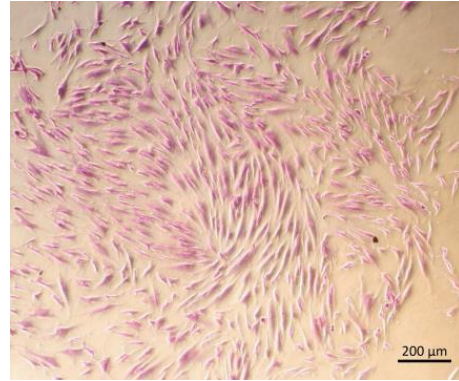


Abbildung 24 Teststatistik Colony Forming Unit nach 7 Tagen

control = Basismedium, infl. = Entzündungsmedium, oxLDL = oxidiertes Low Density Lipoprotein



(a)



(b)



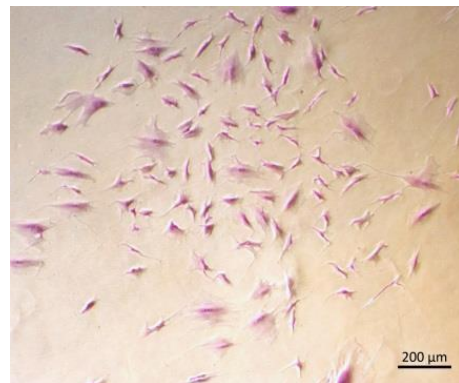
(c)



(d)



(e)



(f)

Abbildung 25 Colony Forming Unit (CFU)

Repräsentiert werden in den Bildern die Colony Forming Units (CFU) nach sieben Tagen Stimulation mit

- (a) und (b) Basismedium
- (c) und (d) Entzündungsmedium
- (e) und (f) oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL)

und nachfolgender Färbung mit Kristallviolett. Dabei handelt es sich bei a, c, und e um fotografische Aufnahmen, wohingegen b, d und f mit dem Mikroskop aufgezeichnet wurden.

3.4 Zellproliferationskurven

Mithilfe der Neubauerzählkammer konnte am Tag eins in allen drei Gruppen eine vergleichbare Zellzahl als Ausgangspunkt bestimmt werden. Im Verlauf war das Wachstum im Entzündungsmedium und unter Behandlung mit oxLDL zunächst beschleunigt. Insgesamt stieg die Zellzahl allerdings geringer an als im Basismedium. Zusätzlich ließ sich ein schnellerer Abfall der Kurven feststellen, wobei beim oxLDL die Zellzahl bereits nach sechs Tagen abnahm. Im Vergleich dazu stellte sich eine Reduktion der Zellproliferation erst am Ende der zwei Wochen im Basismedium ein. In der statistischen Auswertung konnte die obige Beobachtung mit signifikanten Unterschieden zwischen allen drei Gruppen belegt werden ($p=0,007$ im Friedman-Test). Im darauf folgenden Wilcoxon-Rang-Test zum paarweisen Vergleich der Gruppen wurden ebenfalls signifikante Ergebnisse ($p=0,043$) erzielt. Bezüglich der Ränge zeichnete sich das Basismedium durch die Positivsten gegenüber dem Entzündungsmedium und oxLDL aus. Bei Betrachtung des Zusammenhangs zwischen den beiden zuletzt genannten Gruppen wies die Inflammationsgruppe (infl.) die höheren Zellzahlen verglichen zu den mit oxLDL stimulierten Zellen auf (Abbildung 26).

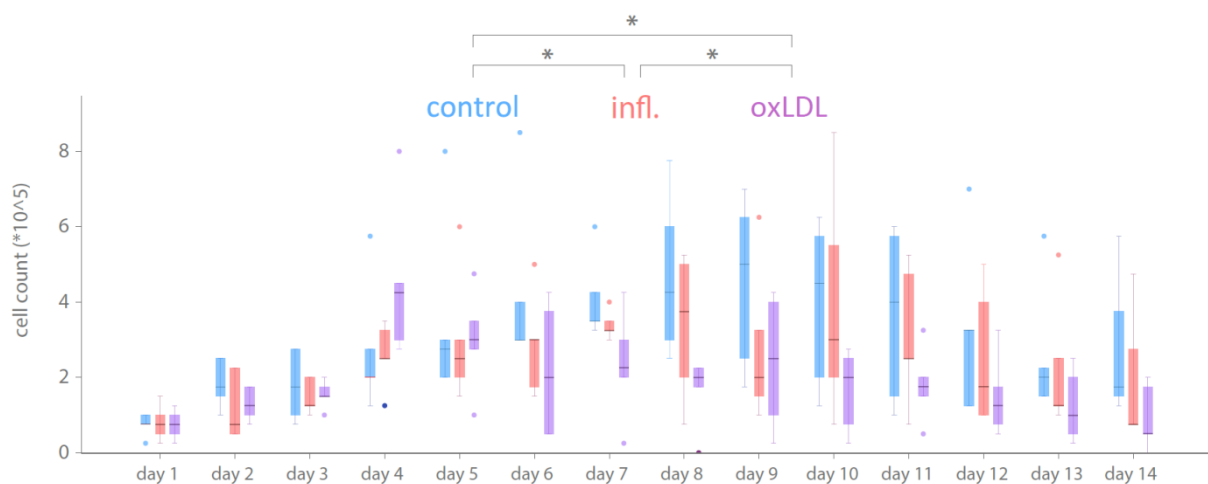


Abbildung 26 Proliferationskurven

Die Abbildung verdeutlicht statistisch zusammengefasst über 14 Tage die Zellproliferation verglichen zwischen den drei Gruppen: Basismedium (control), Entzündungsmedium (infl.) und oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL).

Weiterhin unterschieden sich die drei Gruppen hinsichtlich des adhärenen Verhaltens an der Unterlage. Dem Versuchsprotokoll entnehmend wurden die Zellen für circa fünf Minuten durch die Inkubation mit verdünnter Accutase in Lösung gebracht, was sich durch eine kugelige Zellform bestätigte. Zu beobachten war dabei jedoch ein verstärktes Verkleben und Anhaften der zuvor mit oxLDL stimulierten G-MSCs, sodass ein stärkeres plastik- und zelladhärentes Potenzial im Kontrast zu den ersten beiden Gruppen in Erscheinung trat (Abbildung 27).

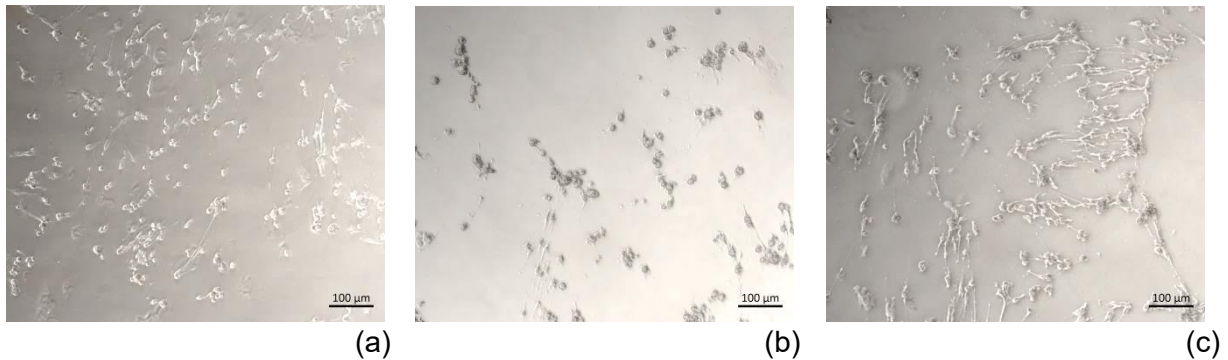


Abbildung 27 Mikroskopische Aufnahme nach 5 minütiger Behandlung mit Accutase

Dargestellt sind die gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs) nach Stimulation mit (a) Basismedium (b) Entzündungsmedium und (c) oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) nach Behandlung mit Accutase bei 10x Vergrößerung. Eine kugelige Zellform (a, b) wurde von adhären wachsenden Zellen eingenommen, wenn sie von der Oberfläche abgelöst worden sind.

3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Im Rahmen der PCR wurden die G-MSCs hinsichtlich ihrer charakteristischen genetischen Marker untersucht, wobei Veränderungen im Expressionsprofil auf mRNA-Ebene analysiert wurden. Zusätzlich fanden kontinuierlich mikroskopische Aufnahmen statt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren. Ausgangspunkt waren 80 % konfluente, geordnete und parallel ausgerichtete Stammzellen (Abbildung 28).

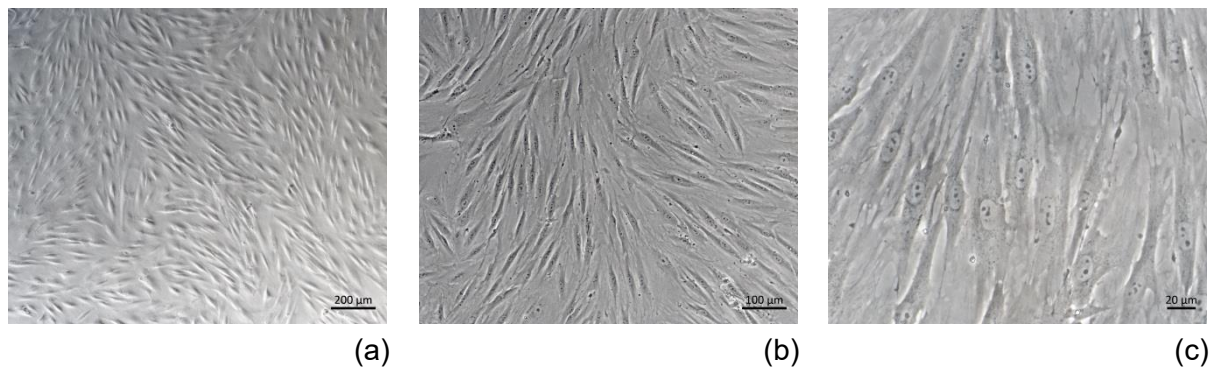


Abbildung 28 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSC) vor Stimulation

Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop (a) 5x Vergrößerung (b) 10x Vergrößerung (c) 32x Vergrößerung

Nach Ablauf der siebentägigen Stimulation konnten Unterschiede in der Morphologie der G-MSCs festgestellt werden. Während sich die Zellen im Basismedium unbeeinflusst weiterentwickeln konnten und proliferierten, präsentierten die G-MSCs im Entzündungsmedium bzw. im oxLDL-haltigen Medium dezente Veränderungen der Form. Bei gleichbleibender struktureller Anordnung zeigten die Zellen leuchtend hellere Areale und kleine dunkle Partikel. Daran anschließend ließen sich gelöste Zellreste vermehrt in Lösung nachweisen (Abbildung 29).

Die Auswertung für die stammzellspezifischen Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgte im Verlauf an den Tagen eins, drei, fünf und sieben.

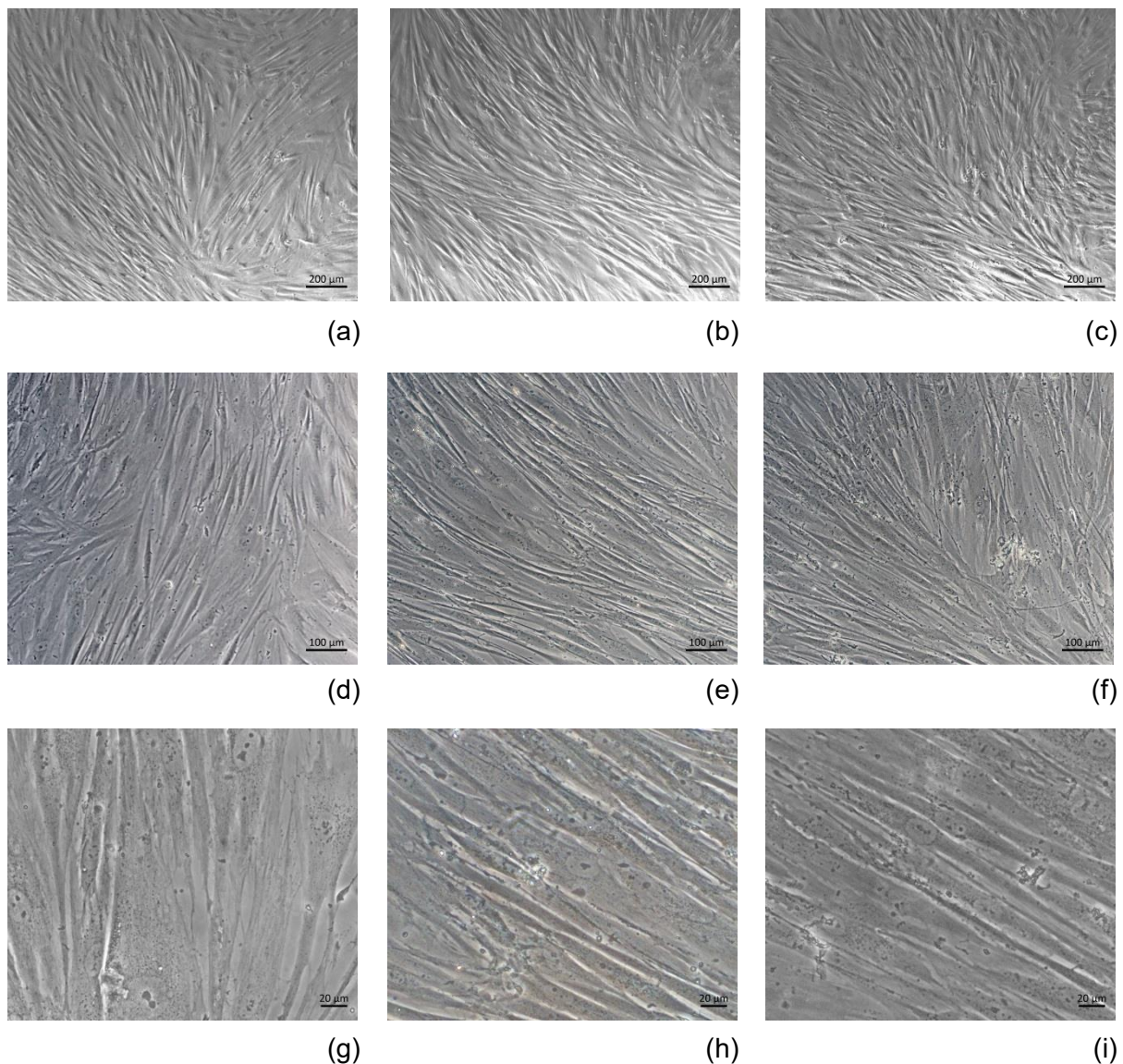


Abbildung 29 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSC) nach sieben Tagen Stimulation

Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop nach einer Woche Stimulation mit

- (a), (d) und (g) Basismedium
- (b), (e) und (h) Entzündungsmedium
- (c), (f) und (i) oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL)

Am ersten Tag ließen sich für die drei Gene NANOG ($p=0,549$), SOX-2 ($p=0,692$) und OCT-4 ($p=0,819$) keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den verschiedenen stimulierten Zellfraktionen im Friedman-Test nachweisen. Auch während der weiteren Versuchsanalyse blieben die Ergebnisse für das Aufzeigen eines Unterschieds in der Genexpression nicht signifikant. Bei Betrachtung der absoluten Werte sowie der graphischen Darstellung anhand der Box-Plots zeigte sich eine verstärkte Expression der drei Gene im Basismedium im Gegensatz zu den unterdrückend wirkenden inflammatorischen bzw. metainflammatorischen Medien (Abbildung 30).

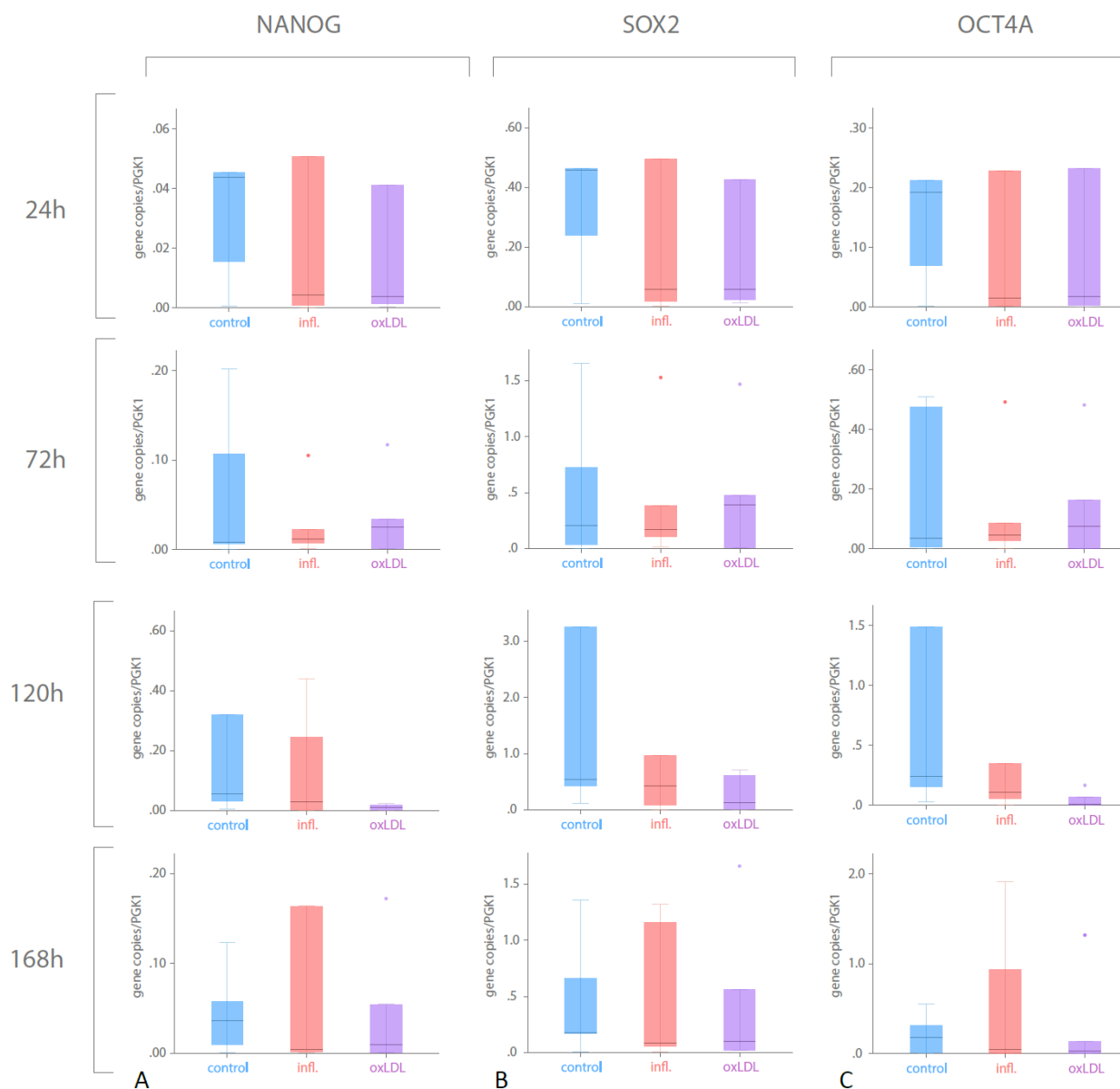


Abbildung 30 Genexpressionsprofil: Stammzellgene

RNA-Extraktion der für Stammzellen charakteristischen Transkriptionsfaktoren:

- A: NANOG (Homeobox protein NANOG),
- B: SOX-2 (sex determining region Y (SRY)- box 2) und
- C: OCT-4 (Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4).

Gemessen wurde die Expression in den drei Gruppen an den Tagen eins, drei, fünf und sieben nach Beginn der Stimulation.

4. Diskussion

G-MSCs zeichnen sich für regenerative medizinische Ansätze durch eine minimal-invasive und leicht zugängliche Isolierung sowie durch optimale Eigenschaften, zum Beispiel im Hinblick auf die Immunmodulation aus. Die gemäß der International Society for Cellular Therapy definierten minimalen Kriterien für Stamm-/Progenitorzellen wurden von den G-MSCs in der vorliegenden Studie erfüllt (Dominici, et al., 2006) (Venkatesh, Kumar, & Alur, 2017) (Liu, et al., 2020).

Frühere Studien weisen auf eine bidirektionale Beziehung zwischen einer Parodontitis und atherosklerotischen Erkrankungen sowie zwischen einer Parodontitis und einer Hyperlipidämie hin (Nazir, 2017) (Almeida, Fagundes, Maia, & Lima, 2018) (Liu, et al., 2020). Entscheidende Aspekte in der Pathophysiologie werden dabei regelhaft auf oxidativen Stress und das Vorkommen von oxidiertem Low Density Lipoprotein zurückgeführt, welches repräsentativ für eine metabolische Inflammation im Organismus steht (Trpkovic, et al., 2015) (Eisenstecken, Gostner, Fuchs, & Überall, 2012). Konkrete Untersuchungen bezüglich des Einflusses von oxLDL auf die regenerativen Eigenschaften der G-MSCs existieren derzeit jedoch nicht. Um vergleichbare Aussagen treffen zu können, wurden die Zellen in der aktuellen Studie neben dem oxLDL (in einer Konzentration von 50 µg/ml) ebenfalls getrennt mit einem proinflammatorischen Zytokin-Gemisch stimuliert. Dieses setzte sich zusammen aus 1 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ und spiegelt das entzündliche Mikroenvironment in-vitro wider. Während des Prozesses der Geweberegeneration durchlaufen die Stammzellen zunächst eine proliferative Phase, gefolgt von einer Differenzierung, wobei beide Vorgänge entscheidend für die Reparatur des lädierten Gewebes sind. Nach einer kurzen Diskussion der Methodik werden in den folgenden Abschnitten die Ergebnisse separat interpretiert und im Hinblick auf die übergreifende Fragestellung diskutiert sowie in den Kontext der aktuellen Studienlage gestellt.

4.1 Methodendiskussion

Zunächst stellt sich die Frage, inwieweit die in-vitro Ergebnisse auf das komplexe humane Zusammenspiel der Zellen im Körper übertragbar sind. Beispielsweise sind eine Reihe lokaler Faktoren am Aufbau des jeweiligen Milieus im Organismus beteiligt, von denen Differenzierung, Proliferation und Apoptose abhängen. Alleine die Kultivierung der Zellen außerhalb des menschlichen Körpers birgt die Gefahr, Artefakte zu erzeugen. Weiterhin könnten davon abweichende Ergebnisse erzielt werden, wenn die Stammzellen von Patienten isoliert worden wären, die über einen längeren Zeitraum bereits an einer Parodontitis bzw. einer chronischen Hyperlipidämie mit demzufolge kumulierenden Schäden durch zytokinvermittelte oder metabolische Inflammation leiden.

Humane Stammzellen sind eingegliedert in ein komplexes Netzwerk und werden bezüglich der Selbsterneuerung und Differenzierung unter anderem durch ihre Mikroumgebung reguliert. Verschiedene Proteine und Signalwege, zum Beispiel der Wnt-Signalweg, sind an dieser Regulation beteiligt (Foulquier, Daskalopoulos, Lluri, Hermans, Deb, & Blankesteyn, 2018). In der vorliegenden Studie wurden die G-MSCs stets außerhalb der Interaktion mit anderen Zellen betrachtet. Außerdem wurden die Stammzellen kontinuierlich ex-vivo passagiert und kultiviert. Die damit einhergehende Alterung und replikative Seneszenz steht in Zusammenhang mit einem größeren oxidativem Stress. Demzufolge ist die Anzahl der möglichen Passagen und die Qualität der Zellen mit der Zeit eingeschränkt (Denu & Hematti, 2016). In diesem Rahmen gilt es auch eine mögliche Interaktion von den verschiedenen Typen der Inflammation zu beachten, das heißt bei gleichzeitigem Vorliegen erhöhter Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und oxLDL. Zuletzt wurden in der Literatur definierte Konzentrationen und Stimulationszeiträume verwendet. Veränderungen dieser Variablen können zu abweichenden Resultaten führen.

4.2 Effekte von oxLDL auf die Osteogenese

Anhand der Färbung mit Alizarinrot und anschließender Messung der optischen Dichte ließ sich ein förderlicher Effekt von oxLDL auf die extrazelluläre Matrixkalifizierung, das heißt unter anderem auf die Einlagerung von Calciumphosphat, feststellen. Dabei handelt es sich um einen späten Marker der osteogenen Differenzierung.

Wie oben beschrieben zeigt die oxidative Modifikation des LDLs eine gewisse Abhängigkeit von vorhandenen ROS und RNS. In einer vorherigen Studie von Denu und Hematti wird auf eine gehemmte Osteogenese mesenchymaler Stammzellen durch ROS hingedeutet. Dabei müsse aber das Alter als negativer Faktor für das osteogene Potenzial zusätzlich in Betracht gezogen werden. Denu und Hematti erhielten allerdings kontroverse Ergebnisse und postulierten zudem Hinweise auf eine erforderliche basale Konzentration von ROS, die als förderlich für die Kalzifizierung und Osteogenese angesehen werden könne (Denu & Hematti, 2016). Die in der vorliegenden Analyse verwendete Konzentration von 50 µg/ml oxLDL liegt über den in-vivo erreichten Serumspiegeln und unterstützt die in-vitro Kalzifizierung. Daher sollten differenziert die Effekte allgemein auf die Osteogenese eingeschlossen der osteoblastären Differenzierung gegenüber der alleinigen Matrixkalzifizierung betrachtet werden.

Zunächst werden Aspekte der Matrixkalzifizierung unter Berücksichtigung vorheriger Studienergebnisse diskutiert. Eine Imbalance in der Homöostase des Calciumphosphat-Haushaltes resultiert in ektopen Kalzifikationen im Körper. Hohe Konzentrationen oxLDL stellen dabei ein konsistentes Kennzeichen für Verkalkungen dar, die sich nicht am physiologischen Ort im Körper befinden. Dazu zählen Zahnstein, Nierensteine und von einer Arteriosklerose betroffene Gefäßabschnitte. OxLDL fördert insbesondere die Ablagerung amorpher Calciumphosphat-Präzipitate, was sich durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt. Demzufolge kann oxLDL die Kalzifikation von Zähnen und Knochen beschleunigen und auf diese Weise das Gleichgewicht aus Mineralisierung und Demineralisierung im Rahmen der Entstehung von Zahnkaries stören (Yamashita, Nomura, Ishikawa, Shimoda, & Hanada, 2020). Ebenso scheint oxLDL gemessen in gefällten Immunkomplexen ein Prädiktor für die Entwicklung und das Voranschreiten einer Koronararterienverkalkung zu sein. Diese Aspekte unterstützen die These einer proinflammatorischen und proatherogenen Wirkung von oxLDL (Lopes-Virella, Baker, Hunt, Lachin, Nathan, & Virella, 2011) und stehen im Einklang mit den aktuell erhaltenen Ergebnissen.

Darüber hinaus gibt es zahlreiche Untersuchungen, die sich auf den Einfluss von oxLDL auf vaskuläre Verkalkungen beziehen. An dieser Stelle werden die zellulären Interaktionen und beteiligte molekulare Mechanismen in dem Netzwerk berücksichtigt. Verkalkte Gefäßläsionen sind charakterisiert durch die Anwesenheit osteo- und chondroblastenähnlicher Zellen, die aus der phänotypischen Plastizität vaskulärer Zellen hervorgehen. Die vaskuläre Verkalkung resultiert aus einer durch Makrophagen vermittelten Entzündungsreaktion und aus der osteochondrogenen Transition vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs, vascular smooth muscle cells). Beteiligte Mechanismen sind die Aktivierung der β -Catenin-unabhängigen und -abhängigen Wnt-Signalwege sowie die Beendigung der PPAR γ -Signaltransduktion. Diese regulieren über verschiedene Transkriptionsfaktoren die Transformation zu osteochondrogenen Zellen. Diskutiert wird die Möglichkeit, PPAR γ -Agonisten in der Frühphase bei Patienten mit Atherosklerose einzusetzen. Die Aktivierung von PPAR γ führt über antiinflammatorische Prozesse und eventuell über Hemmung der osteochondrogenen Transition der glatten Muskelzellen in den Gefäßen zu einer Regression atherosklerotischer Plaques (Reinhold, Blankesteyn, & Foulquier, 2020).

Ebenso zeigen kultivierte Endothelzellen unter oxLDL einen vermehrten Übergang zu mesenchymalen Zellen unter paralleler Erhöhung der osteogenen bzw. chondrogenen Transkriptionsfaktoren (Yung, Sánchez-Duffhues, Ten Dijke, & Yu, 2015).

Darüber hinaus gibt es Studien, die die Rolle von Fraktalkin und seinem spezifischen Rezeptor CX3CR1 bezüglich der beschleunigten osteogenen Transformation von VSMCs sowie insgesamt deren förderlichen Beitrag zur atherosklerotischen Verkalkung untersuchen. Durch Einwirkung von oxLDL auf die VSMCs werden beide Gene hochreguliert und folglich die Expression osteogener Marker, wie RUNX2, induziert. Stammzellen besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Expression von CX3CR1 und können durch das Vorhandensein von Chemokinen an den Ort einer Läsion angezogen werden, zum Beispiel nach einer Entzündung oder Ischämie. Ebenfalls spielt die Interaktion zwischen Fraktalkin/CX3CR1 eine entscheidende Rolle im Rahmen der entzündlichen Komponente der Atherosklerose, indem die Faktoren proinflammatorisch und zytotoxisch auf das Endothel wirken (Yang, et al., 2020) (Li, et al., 2019) (Liu & Jiang, 2011).

Zusammengenommen betrachtet, dienen diese Effekte als Erklärung für ein osteoinduktives Potential von oxLDL auf die G-MSCs Kulturen und können als Initiative für weitere Analysen auf molekularer Ebene dienen.

Die Regulation der vaskulären Verkalkung erfolgt in Abhängigkeit von osteogenen Faktoren, dazu werden SPARC, ALP und RUNX2 gezählt. Ein knochenassoziiertes Protein, welches insbesondere in der Knochenbildung und -Mineralisation entscheidend Einfluss nimmt, ist Osteonectin. Dieses wird auch als SPARC bezeichnet. In Betracht zu ziehen sind dabei verschiedene Mechanismen unter anderem die Prokollagenverarbeitung und -zusammensetzung, die Mineralisierung, als auch die Differenzierung bzw. die Aktivität der knochenauf- und abbauenden Zellen (Rosset & Bradshaw, 2016). Die Expression von SPARC erfolgt unter anderem in atherosklerotisch veränderten Gefäßen und scheint die vaskuläre Kalzifikation zu fördern. Mineralisiertes Gewebe weist zudem hohe Expressionswerte der ALP auf. Die Funktion des Enzyms besteht in der Erhöhung lokaler Konzentrationen von anorganischem Phosphat und letztlich in der Förderung der Mineralisierung extrazellulärer Matrix, das heißt der Produktion von Hydroxylapatit (Vimalraj, 2020). RUNX2 stellt einen essentiellen Transkriptionsfaktor sowohl für die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten, als auch für die Chondrozytenproliferation dar. Dadurch erhielt RUNX2 seine primäre Bedeutung im Zusammenhang mit der Skelettentwicklung (Komori, 2020).

In der vorliegenden Studie konnten für SPARC und ALP minimal erhöhte Expressionswerte unter Stimulation mit oxLDL festgestellt werden, wohingegen sich RUNX2 im Verhältnis zur Kontrolle unbeeinflusst zeigte.

Vergleichbare Ergebnisse bestehen an dieser Stelle lediglich in Bezug auf andere Zellarten als MSCs. Glatte Muskelzellen aus der Gefäßwand werden durch die Behandlung mit oxLDL zur Expression höherer Osteonectin-Spiegel stimuliert. Basierend auf dieser Hochregulation osteogener Faktoren kann oxLDL die vaskuläre Kalzifikation potenzieren. In der vorliegenden Studie lässt sich dies durch die Alizarinrotfärbung und die Gensequenzierung im Rahmen der osteogenen Differenzierung auch für die G-MSCs darstellen. Ebenso deuten die Ergebnisse von Farrokhi et al. auf eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors RUNX2 hin, der parallel zur Kalzifizierung eine zentrale Rolle in der Differenzierung von Osteoblasten und in der Knochenbildung spielt. Die SPARC Expression steigt in diesem Zusammenhang unabhängig von RUNX2. Bei der Wirkung von oxLDL auf glatte vaskuläre Muskelzellen müssen daher vermutlich weitere Transkriptionsfaktoren berücksichtigt werden (Farrokhi, Samani, Hashemzadeh, & Tabatabaiefar, 2015).

Zusätzlich konnte in vorherigen Studien eine vermehrte Expression vom Bone morphogenetic Protein-2 (BMP-2) und ALP in Aortenklappen-Interstitialzellen nachgewiesen werden, die zuvor mit oxLDL stimuliert wurden. Ebenfalls bei Behandlung humaner Endothelzellen in Koronararterien wurden derartige Effekte beobachtet. Dieser über den Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2) vermittelte Effekt belegt die proosteogene Wirkung von oxLDL (Song, et al., 2013). Darüber hinaus wird durch Stimulation mit oxLDL auch in endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark die Ossifikation ausgelöst unter signifikanter Erhöhung der ALP-Aktivität (Liu, Liu, Chen, Zhang, Kong, & Kang, 2011).

Ein weiterer Mechanismus ist der Wnt/GSK-3 β / β -Catenin-Weg. Über diesen verstärkt oxLDL bei Aortenklappen-Myofibroblasten die Expression osteoblastischer Genmarker und führt daraus resultierend zur Erhöhung des extrazellulären Knochenmatrixproteins (Gao, et al., 2015). Demzufolge stellt sich beim Vergleich mit vorherigen Forschungsergebnissen heraus, dass oxLDL auf verschiedene Zellarten über die Erhöhung der osteogenen Transkriptionsfaktoren einen förderlichen Effekt auf die Kalzifizierung hat.

Die Auswirkung von oxLDL auf die osteogene Proliferation lässt sich indirekt von den leicht erhöhten osteogenen Transkriptionsfaktoren und der verstärkten Matrixkalzifizierung übertragen. Demzufolge kann eine erhöhte Zellzahl während der Osteoblastogenese postuliert werden.

Eine Studie von Dawodu et al. untersuchte die zuvor wenig berichteten Auswirkungen von oxLDL auf die Osteoblastogenese in MSCs. OxLDL in einer Konzentration von 10-25 μ g wird dabei als ein Inhibitor betrachtet, welcher abhängig vom immunphänotypischen Oberflächenmerkmal CD36 (Cluster of differentiation 36, Thrombozytenglykoprotein 4) durch Herunterregulation von β -Catenin den Wnt-Signalweg unterdrückt. Auf diese Weise wird die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten gehemmt (Dawodu, Patecki, Dumler, Haller, & Kiyani, 2019).

In anderen Studien hingegen konnten für das proatherogene oxLDL zwei gegensätzliche Wirkungen in Abhängigkeit von der Konzentration auf humane Osteoblasten bzw. murine osteogene Progenitorzellen festgestellt werden. Niedrige Konzentrationen oxLDL (20-50 μ g/ml) induzieren eine gesteigerte Proliferation der knochenbildenden Zellen. Höhere Konzentrationen hingegen stimulieren die Apoptose der Osteoblasten. Hamel et al. beschreiben für niedrige Konzentrationen oxLDL eine reduzierte Aktivität der ALP mit dem Hinweis auf eine abnehmende osteoblastäre Funktion sowie eine eingeschränkte Migration der Zellen. Die Stimulation der Proliferation geht demzufolge einher mit einer beeinträchtigten Differenzierung zu kompetenten knochenbildenden Zellen.

Sowohl die Migration als auch die Aktivität der ALP stellen essentielle Funktionen für die Knochenbildung, das Remodeling und die Frakturreparatur dar. Letztlich wird durch niedrige und höhere Konzentrationen oxLDL der balancierte Knochenstoffwechsel auf zwei unterschiedlichen Wegen gestört (Hamel, Abed, Brissette, & Moreau, 2008). Mit einer Konzentration von 50 µg/ml liegt die aktuelle Untersuchung im Grenzbereich zwischen den beiden beschriebenen Gruppen. Tendenziell zeigt sich indirekt eine gesteigerte Proliferation. Dabei ist nicht auszuschließen, dass bereits in einigen G-MSCs bzw. osteoblastären Vorläufern die Apoptose induziert und somit der proliferative Effekt abgemildert wird. Zusätzlich kann eine eingeschränkte Funktionalität ursächlich für eine verhältnismäßig zum Basismedium geringe Mehrkalzifizierung sein.

Den Osteoblasten stehen zur Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase die knochenabbauenden Zellen, die sogenannten Osteoklasten, gegenüber. OxLDL hemmt die resorptive Aktivität der Osteoklasten, was einen weiteren Hinweis auf die verstärkte Matrixkalzifizierung liefert. Zu beachten gilt dies vorwiegend im Organismus mit den multiplen Zellinteraktionen im Vergleich zu den im Versuchsaufbau isoliert betrachteten G-MSCs. Dem gegenübergestellt verfügen proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α und IL-6, über das Potenzial, die Differenzierung pathologischer Osteoklasten und osteoklasten-ähnlicher Zellen zu induzieren mit der Folge einer exzessiven Knochenresorption. Dies weist wiederum auf eine verminderte Verkalkung im Rahmen der zytokinvermittelten Entzündung hin (Yokota, 2017) (Dawodu, Patecki, Hegemann, Dumler, Haller, & Kiyon, 2018).

Zusammenfassend ergibt sich für die Beeinflussung der osteogenen Differenzierung humaner G-MSCs unter oxLDL eine vermehrte Kalzifizierung der Matrix bei gesteigerter Osteoblastogenese und damit eine insgesamt proosteogene Wirkung. Im Gegensatz zur zytokinvermittelten Entzündung lässt sich somit ein positiver Effekt von oxLDL auf die G-MSCs unter Erhalt und sogar Induktion der Stammzellfunktion zur osteogenen Differenzierung aufzeigen.

Probleme ergeben sich jedoch im Organismus durch die ektope Kalzifizierung und ein daraus resultierendes Fortschreiten einer Atherosklerose und Zahnsteinentwicklung. Die Bildung von Zahnstein kann als ein dynamischer Prozess aus Mineralisierung und Demineralisierung beschrieben werden. OxLDL greift in dieses Gleichgewicht als Störfaktor ein, fördert die ektope Kalzifizierung und hemmt zudem die Osteoklasten in ihrer Funktion. Zahnstein und die zusätzliche Besiedelung durch orale Bakterien führen dann zur Karies und Schädigung der Zähne bis hin zur Entwicklung einer Parodontitis und zum Zahnverlust.

4.3 Effekte von oxLDL auf die Adipogenese

Im Zusammenhang mit der Adipogenese potenzieren die inflammatorischen Medien insbesondere oxLDL die intrazelluläre Bildung von Fettvakuolen als Hinweis auf eine verstärkte Ausdifferenzierung zu Adipozyten. Verdeutlicht wird dieser Aspekt sowohl anhand der morphologischen Färbung, als auch anhand der anschließenden Quantifizierung mittels Messung der optischen Dichte. Statistisch wird jedoch keine Signifikanz erreicht.

Ergebnisse von Parhami et al. weisen auf eine verminderte osteogene Differenzierung zugunsten einer Adipogenese von entsprechenden Vorläuferzellen bzw.

Knochenmark-Stromazellen unter Stimulation mit oxLDL hin und untermauern damit die obige Beobachtung der vorliegenden Arbeit. Weder natives LDL noch minimal oxidiertes LDL induzieren in der Studie von Parhami et al. alleine die Adipogenese. Signifikant beschleunigt wird die adipogene Differenzierung, welche ebenfalls durch Anfärbung mit Oil Red O quantifiziert wird, durch die gleichzeitige Behandlung der Knochenmark-Stromazellen mit oxLDL und Thiazolidindionen (Glitazonen). Bei Thiazolidindionen handelt es sich um selektive PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor)-Agonisten. PPAR γ greift als ein Hauptfaktor regulatorisch in die adipogene Differenzierung ein. Im Gegensatz dazu kommt es unter simultaner Hinzugabe von nativem LDL zu den PPAR γ -Agonisten zu keiner forcierten Differenzierung, sodass der Effekt auf die Oxidation zurückzuführen ist. Vermutet wird außerdem zum Teil eine direkte Aktivierung von PPAR α durch oxLDL und darüber die Förderung der Adipogenese (Parhami, et al., 1999).

Die Aktivierung und Hochregulation durch Bindung spezifischer Liganden von PPAR γ spielt auch eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von MSCs zu Adipozyten (Almalki & Agrawal, 2016). Verschiedene Studien belegen dabei einen Effekt von oxLDL am PPAR γ , über den indirekt eine Reihe weiterer Mechanismen und Signalkaskaden aktiviert werden (Nicholson, Febbraio, Han, Silverstein, & Hajjar, 2000) (Unno, et al., 2005).

Ebenso sind ROS und Adipogenese positiv miteinander korreliert. Unter anderem kann gezeigt werden, dass die vom mitochondrialen Komplex III generierten ROS notwendig sind zum Aktivieren adipogener Transkriptionsfaktoren (Denu & Hematti, 2016).

Über unmittelbare Auswirkungen von oxLDL auf die Adipozyten existieren derzeit nur wenige Informationen. Es kann jedoch aufgezeigt werden, dass die insulinabhängige Glukoseaufnahme unter oxLDL signifikant abnimmt, die Sekretion von TNF- α , IL-6 und Adiponektin ansteigt, während die Leptinspiegel sinken. Weiterhin kommt es zu einer vermehrten Expression von Markern, die im Zusammenhang mit Apoptose, Nekrose und Autophagie auftreten. Insgesamt kann von einer proinflammatorischen und proapoptotischen Wirkungsweise von oxLDL auf die Adipozyten gesprochen werden, was durch eine LOX-1-Überexpression noch verstärkt wird (Santiago-Fernández, et al., 2020). Die zunehmende Expression von LOX-1 resultiert zudem in vermehrter Schaumzellbildung im Rahmen der Atherosklerose. Es zeigt sich eine Akkumulation von phagozytierten Lipidtröpfchen in den Schaumzellen, wobei parallel zur Hochregulation von LOX-1 die Tröpfchenanzahl ansteigt (Yang, Mohamed, & Zhou, 2012). Zusammenfassend potenziert oxLDL die adipogene Ausdifferenzierung entsprechender Vorläuferzellen, wobei die Wirkung am PPAR γ eine entscheidende Funktion einnimmt. Nicht eindeutig geklärt bleibt aber, inwieweit dieser Mechanismus in die Regulation der Ausdifferenzierung von G-MSCs involviert ist.

Die Lipoproteinlipase (LPL) ist ein Enzym, welches unter anderem im Plasma von Fett- und Muskelgewebe vorkommt. Die Funktion besteht in der Spaltung von Triglyceriden im Stoffwechsel der Chylomikronen und VLDL, wodurch Fettsäuren freigesetzt werden. Je größer die Menge des vorhandenen Enzyms, desto größer ist die Kapazität der Zellen Fettsäuren von Lipoproteinen aufzunehmen (Gressner & Arndt, 2019). Kontrovers diskutiert wird die Rolle der LPL im Zusammenhang mit der Atherosklerose. Im Fett- und Muskelgewebe wird eine protektive Funktion durch Entfernung zirkulierender Lipide aus dem Blut und Erhöhung der HDL-Fraktion angenommen. Ebenso kann eine verbesserte Glukose- und Insulintoleranz zusammen mit einem erhöhten Energieverbrauch nachgewiesen werden, die aus einem veränderten Phänotyp des Fettgewebes resultieren. Hingegen scheint sich die LPL in größeren Arterien proatherogen auszuwirken. Dort erfolgt die Synthese durch Makrophagen, die sich unterstützt durch die LPL vermehrt zu Schaumzellen umwandeln (Reinbold, 2007) (Walton, et al., 2015).

Die Analyse der LPL-Genexpression zeigt in der aktuellen Studie keine Differenzen zwischen den unterschiedlichen Medien auf bzw. eine leicht verminderte Expression der LPL in den Entzündungsmedien. In Anbetracht der Funktion der LPL spiegeln sich damit vermutlich die proatherogenen Effekte von oxLDL wider, da geringere LPL-Konzentrationen im Fettgewebe assoziiert sind mit einer Atherosklerose (Reinbold, 2007).

Eine antiatherogene Herunterregulation der LPL in Makrophagen zeigt sich in einer Studie von Xie et al in Abhängigkeit vom Krüppel-ähnlichen Faktor 14 (KLF14). Daraus resultieren eine inhibierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und eine verminderte Lipidakkumulation. Im Bereich atherosklerotischer Läsionen oder bei zuvor mit oxLDL stimulierten Makrophagen wird von einem erniedrigten Spiegel des KLF14 berichtet (Xie, et al., 2019). Daraus würde sich bei vorliegender Atherosklerose und einem Fehlen bzw. verminderter Existenz des KLF14 ein stärkeres Vorkommen der LPL ergeben. An dieser Stelle wird der Fokus allerdings auf die LPL in Makrophagen im Unterschied zur Stammzelle gelegt.

Des Weiteren ist die LPL kolokalisiert mit oxLDL in kalzifizierenden Aortenklappen insbesondere in Bereichen, die reich an Makrophagen sind. Die Höhe der exprimierten LPL korreliert dabei mit der oxLDL-Konzentration. Letztlich ist die LPL beteiligt an der Lipidretention und stellt einen möglichen Mechanismus mit Beitrag zum Remodeling an der Aortenklappe dar (Mahmut, et al., 2013).

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen erfolgte in der vorliegenden Studie die Genexpressionsanalyse an isolierten G-MSCs ohne die multiplen Interaktionen mit Makrophagen. Insgesamt kann durch die Stimulation mit oxLDL eine Lipidakkumulation bei leicht verminderter LPL nachgewiesen werden. Unter diesem Gesichtspunkt kann die These einer proatherogenen Wirkungsweise von oxLDL auf das Fettgewebe belegt werden. Die LPL im Fettgewebe hat tendenziell eine protektive Funktion. Die Expression erscheint daher für den Bedarf zu gering. Somit kann zusätzlich der Rückschluss auf eine Schädigung der adipozytären Funktion und damit auf eine behinderte Adaptationsfähigkeit auf metabolische Dysbalancen gezogen werden.

Mithilfe der Oil Red O Färbung kann darüber hinaus ein großer Teil der synthetisierten intrazellulären Vakuolen nicht als Fetttropfchen identifiziert und angefärbt werden. Dieser Aspekt lässt auf die Bildung anderer kleiner Hohlräume vermuten, die ungefärbt unter dem Mikroskop zunächst den Fettvakuolen ähneln. Auffallend ist dabei neben der erhöhten Anzahl eine Zunahme des Durchmessers der Vakuolen unter Einfluss von oxLDL gegenüber dem Basismedium und Entzündungsmedium.

Im Körper findet zu jeder Zeit ein programmierter Zelltod statt, um die zelluläre Homöostase zu bewahren. Während dieser Apoptose wird die Zelle in kleine Fragmente zerlegt, die als apoptotische Körper bezeichnet werden. Zusammen mit Exosomen und Mikrovesikeln werden die apoptotischen Körper als extrazelluläre Vesikel klassifiziert (Paone, Baxter, Hulett, & Poon, 2019). Extrazelluläre Vesikel sind 30-1000 nm große Vesikel, die Nukleinsäuren und Proteine beinhalten. Ihre Sekretion steigt als Antwort auf eine Inflammation, Hypoxie und im sauren Mikroenvironment. Verschiedene Methoden wurden zur Isolation der extrazellulären Vesikel aus humanem Serum entwickelt, wobei ein besonderer Aspekt in der Trennung von anderen Vesikeln und Lipoproteinen besteht. Unter anderem die Dichte und die Größe können zur Differenzierung angeführt werden. Charakteristisch ist eine geringere Dichte und Größe der Lipoproteine gegenüber den extrazellulären Vesikeln. LDL erreichen beispielsweise eine Größe von ca. 18-23 nm (Brennan, et al., 2020). Vergleicht man diese Beobachtung mit den Abbildungen der adipogenen Differenzierung (Abbildung 19) fallen die größeren Vesikel bei den mit oxLDL stimulierten Zellen verhältnismäßig zum Basismedium auf. Zusätzlich dazu unterstreicht die reduzierte Färbung mit Oil Red O die vermutete vermehrte Bildung extrazellulärer Vesikel. Im Hinblick auf die Wirkung von oxLDL auf die Funktion von Makrophagen wurde bereits eine vermehrte Sekretion extrazellulärer Vesikel, in denen eine spezielle mikroRNA angereichert ist, beschrieben. Die durch Makrophagen sezernierten Vesikel führen in diesem Fall zu einer Akzeleration der Atherosklerose (Zhang, et al., 2019).

Studien konnten demonstrieren, dass MSCs über eine enorme parakrine Funktion verfügen, über die sie die Funktion benachbarter Zellen modulieren. Die MSCs sezernieren ebenfalls zahlreiche extrazelluläre Vesikel und können auf diese Weise zum Beispiel die Geweberegeneration beschleunigen. Im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen wird den von MSCs gebildeten Vesikeln eine kardioprotektive und antioxidative Eigenschaft zugesprochen. Sowohl die Apoptose als auch die Inflammation werden inhibiert und können zur verbesserten kardialen Struktur und Funktion beitragen. Daraus ergibt sich das große Interesse von Forschern, extrazelluläre Vesikel von MSCs therapeutisch in der regenerativen Medizin einzusetzen (Keshtkar, Azarpira, & Ghahremani, 2018) (Zhang, Tian, Hao, Xu, & Zhang, 2020).

Offen bleibt aber die Frage, wie die genaue Morphologie der Vesikel aufgebaut ist, die während der Adipogenese unter dem Einfluss von oxLDL in der aktuellen Studie gebildet wurden. Diskutiert werden kann durch das metaentzündliche Mikroenvironment eine Stimulation der G-MSCs. Diese versuchen damit adäquat auf die Entzündung zu reagieren, sich vor größeren Schäden zu schützen und mit den umgebenden Zellen zu interagieren. In Gegenüberstellung dazu gilt es zu berücksichtigen, dass unter den extrazellulären Vesikeln auch die apoptotischen Körper zusammengefasst werden. Demzufolge besteht eine weitere Möglichkeit in der massiven Schädigung der Zellen, die im Anschluss an die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden in die Apoptose übergehen. Der Einfluss von oxLDL auf das Proliferationsverhalten der Zellen und die Induktion des Zelltodes werden im folgenden Abschnitt eingehender beschrieben (siehe 5.6).

Zusammengefasst kann hinsichtlich der adipogenen Differenzierung eine vermehrte Bildung von Fettvakuolen durch oxLDL nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgt die Bildung weiterer Vesikel, deren Funktion nicht ausreichend geklärt ist. Neben einer Protektion ist auch eine Zelledestruktion in Betracht zu ziehen. Letztere kann dabei ebenso eine Ursache für die im Verhältnis reduzierte LPL-Expression sein. Bei Übertragung dieser Ergebnisse auf die Pathophysiologie der Atherosklerose resultiert ein pro-atherogener Einfluss von oxLDL auf die Stammzellen. Letztendlich bleibt das Potenzial zur adipogenen Differenzierung erhalten und wird sogar tendenziell verstärkt.

4.4 Effekte von oxLDL auf die Chondrogenese

Eine durch proinflammatorische Zytokine vermittelte Entzündung hemmt die chondrogene Differenzierung auf morphologischer Ebene, was sich anhand der digitalen Analyse quantifizieren lässt. OxLDL hingegen fördert vergleichbar mit dem Basismedium die Ausdifferenzierung der G-MSCs zu Knorpelzellen.

TNF- α bezeichnet ein pleiotropes Zytokin mit Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von humanen Zellen (Shioda, et al., 2017). Es gibt Hinweise darauf, dass TNF- α die Regeneration von Geweben fördert, indem die osteogene Differenzierung, die Proliferation und Migration von MSCs verstärkt werden. Während der Chondrogenese in vitro wirkt sich TNF- α negativ aus. Dies ist gekennzeichnet durch weniger gebildete Proteoglykane und vermehrt exprimierte Aggrecanasen, bei denen es sich um Knorpel abbauende Enzyme handelt (Stevens, Wheeler, Tannenbaum, & Grodzinsky, 2008).

Ein Angriffspunkt für die Wirkung von oxLDL ist wiederum die Wnt-/ β -Catenin-Signalkette. Hinsichtlich der Chondrogenese spielen die Gene Wnt-5a, -5b und -4 eine entscheidende Rolle und werden verschieden stark exprimiert. Über differente Signalkaskaden wirken sich Wnt-5a und Wnt-4 gegensätzlich zueinander aus. Während Wnt-5a die Reifung von Knorpelzellen hemmt, beschleunigt Wnt-4 diesen Prozess (Hartmann & Tabin, 2000).

Wnts können auf der einen Seite die Stammzellpotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung fördern und auf der anderen Seite die Differenzierung in eine bestimmte Zelllinie steuern, was beispielsweise aus der Aktivität unterschiedlicher Co-Faktoren resultiert. In Abhängigkeit von dem Ursprung der Stammzellen können sich die Wnt-Signalwege im menschlichen Körper unterschiedlich auswirken. Zudem existieren im Widerspruch zueinander stehende Berichte unter anderem über die Effekte auf die osteogene Differenzierung (Foulquier, Daskalopoulos, Lluri, Hermans, Deb, & Blankestijn, 2018). Auswirkungen von oxLDL auf den Wnt-5a-Signalweg sind vielfach erforscht. Über diesen scheint es auch die Pathogenese der Atherosklerose zu beschleunigen, indem Lipide akkumulieren und vermehrt Schaumzellen gebildet werden (Ackers, Szymanski, Silver, & Malgor, 2020). Potenzielle Effekte auf weitere Wnt-Moleküle als Wnt-5a sind bisher nicht beschrieben und stellen daher eine Möglichkeit dar, wie die Auswirkungen auf die chondrogene Differenzierung erklärt werden können.

Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die den Einfluss von ROS auf die chondrogene Differenzierung evaluieren und damit eine Assoziation zur Pathogenese der Atherosklerose darstellen. Mit Bezug auf die Chondrogenese ist die vermehrte ROS-Bildung förderlich für die Differenzierung, wohingegen Antioxidantien, wie N-Acetylcystein, über ROS-Reduktion die chondrogene Differenzierung inhibieren (Denu & Hematti, 2016). An dieser Stelle sollte nochmals bedacht werden, dass eine in vitro durchgeführte Analyse über die Folgen von einer Behandlung der G-MSCs mit oxLDL nicht direkt auf die Auswirkungen in vivo übertragen werden kann. Weitere Faktoren spielen in dem komplexen Zusammenspiel im Organismus eine Rolle und beeinflussen unter anderem die Pathogenese der Atherosklerose.

Auf Ebene der Genexpression lässt sich für Aggrecan, das ein insbesondere im hyalinen Knorpel vorkommendes Proteoglykan bezeichnet, eine leicht erhöhte Expression unter oxLDL feststellen. Somit ist der oben beschriebene Einfluss auf morphologischer Ebene mit der Genexpressionsanalyse in Einklang zu bringen.

Ein frühes Merkmal einer atherosklerotischen Läsion ist die endotheliale Dysfunktion, die wiederum gekennzeichnet ist durch einen Mangel der endothelialen NO-Synthase (eNOS). In Mäusen mit einem derartigen Enzym-Mangel konnten höhere Spiegel Aggrecan, einem der Lipoprotein-bindenden Proteoglykane, gemessen werden. Aggrecan induziert die Apoptose vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs) und trägt somit zur Progression der Atherosklerose bei. Lipoproteine, auf deren Oberfläche das Apolipoprotein B exprimiert wird, werden in der arteriellen Intima gebunden und initiieren die Bildung einer atherosklerotischen Läsion. Zu diesen Lipoproteinen zählt unter anderem das LDL. Ebenso wird berichtet, dass Aggrecan in der Lage ist, die Apoptose von weiteren Zellen hervorzurufen. Der Zelltod wird dabei über den Fas-Rezeptor ausgelöst, der sich auch auf Chondrozyten befindet (Kim, et al., 2019).

Zusammenfassend stellt sich oxLDL als ein positiver Verstärker auf die Chondrogenese vor allem in Gegenüberstellung zur zytokinvermittelten Entzündung dar. Rückblickend lässt sich damit wieder auf die Anwesenheit osteo- und chondroblastenähnlicher Zellen im Bereich verkalkter Gefäßläsionen und damit auf den Zusammenhang zur Atherosklerose verweisen. Diese Beobachtung verdeutlicht nochmals, dass oxLDL zur Pathogenese der Atherosklerose wesentlich beiträgt.

4.5 Beeinflussung grundlegender Stammzell-Eigenschaften durch oxLDL

Adhäsives Verhalten interzellulär bzw. an der Unterlage der Zellen wird durch Behandlung mit oxLDL verstärkt. Trotz mechanischer Unterstützung und einer verlängerten Inkubationszeit des enzymatischen Lösens mit Accutase erfolgte die Zellzahlzählung zur Beurteilung der Proliferation unter deutlich erschwerten Bedingungen.

Es gibt mehrere Hinweise, dass oxLDL über unterschiedliche direkte und indirekte Mechanismen Auswirkungen auf die zellulären Aktivitäten von Stammzellen und Progenitorzellen hat. Als Progenitorzellen definiert man aus der asymmetrischen Zellteilung multipotenter Stammzellen entstandene Vorläuferzellen, die über die Fähigkeit zur Proliferation verfügen und deren Differenzierung auf eine Zelllinie beschränkt ist. Charakteristisch ist zudem ein bestimmtes Muster an Oberflächenmarkern und zellspezifische Funktionen, wie die Bildung von neuen Blutgefäßen (Peters, 2018).

Vorläuferzellen des Endothels (EPCs, endothelial progenitor cells) sind eingegliedert in den Prozess der Neovaskularisation und der Regeneration von Gefäßen, beispielsweise im Rahmen ischämisch vaskulärer Erkrankungen. Im Zusammenhang mit der Atherosklerose zeigen sich weniger EPCs, die sich zudem in einem Zustand eingeschränkter Funktionalität befinden. Als negativer Einfluss wird oxLDL angesehen, welches die Seneszenz induziert, die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-abhängige Differenzierung inhibiert, die Summe der Zellen senkt und die Funktion der EPC dezimiert. In Anwesenheit von oxLDL wird der auf den EPCs exprimierte LOX-1-Rezeptor hochreguliert. Die EPCs gehen früher in die Apoptose, wenn höhere Dosen oxLDL in der Zellumgebung auf sie einwirken und die Gefäßformation wird in Folge dessen vermindert. Bei niedrigerer Konzentration (<10 µg/ml) wird hingegen vermehrt der Alterungsprozess, die sogenannte Seneszenz, über Hemmung der enzymatisch aktiven Telomerase und eine zelluläre Dysfunktion induziert. Interessanterweise fördern geringe Konzentrationen <5 µl/ml oxLDL mittels Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) die Angiogenese. Ebenso wird auch die Fähigkeit der Vorläuferzellen zur Adhäsion, Migration und Tubulusbildung beeinflusst. Antikörper, die gegen LOX-1 gerichtet sind sowie lipidsenkende medikamentöse Statine können die genannten Effekte minimieren (Pirillo, Norata, & Catapano, 2013) (Lin, et al., 2015) (Ma, Chen, Ren, & Han, 2009).

Daran anschließend kann oxLDL über die Bindung an Membranrezeptoren und folgender Internalisierung zytotoxische Wirkungen entfalten oder die Signaltransduktion beeinflussen. Potenziell identifiziert wurden dabei neben LOX-1, der Platelet Activating Factor Receptor (PAFR) und der EGFR. Über LOX-1 aktiviert oxLDL die Seneszenz und die Apoptose, was unter anderem auf eine reduzierte Aktivität der Telomerase zurückzuführen ist. Darüber hinaus werden Zusammenhänge mit einer veränderten Migration und Adhäsion von Zellen angenommen. OxLDL beinhaltet strukturell vergleichbare Domänen zum plättchenaktivierenden Faktor (PAF) und zu PAF-ähnlichen Phospholipiden. Die Bindung an den PAFR induziert die Adhäsion von Monozyten und die Freisetzung von Chemokinen. Über diese wird eine Migration mesenchymaler Stammzellen eingeleitet (Yang, Mohamed, & Zhou, 2012). Weitere Studien belegen die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wie ICAM-1 und E-Selektin, durch akkumuliertes oxLDL (Lii, Yao, Hsieh, Tsai, Liu, & Chen, 2010) (Takei, Huang, & Lopes-Virella, 2001). Korrelierend dazu ist eine Induktion von Adhäsionsmolekülen auf G-MSCs anzunehmen, die wie in den Ergebnissen dargestellt zu einer vermehrten Adhäsion führen und die Zell-Zell-Kontakte verstärken.

OxLDL fördert darüber hinaus die Bildung von Kolonien, was einen bedeutenden Unterschied gegenüber der zytokinvermittelten Entzündung darstellt.

Nur wenige vorherige Studien beschreiben diesen Sachverhalt. Dokumentiert ist allerdings, dass die Anzahl von endothelialen koloniebildenden Zellen sowie deren Fähigkeit zur Bildung von Gefäßen unter hyperglykämischen Bedingungen reduziert ist. Diabetes mellitus bezeichnet eine komplexe metabolische Stoffwechselerkrankung, die durch einen gestörten Glucosestoffwechsel charakterisiert ist. Die Hyperglykämie resultiert in einer endothelialen Dysfunktion und führt nachfolgend zu Gefäßkomplikationen. Dieser Zusammenhang ist vergleichbar mit einer durch oxLDL verursachten Schädigung des Endothels und Atheroskleroseentwicklung. Bei der Inkubation der endothelialen koloniebildenden Zellen mit mesenchymalen Stammzellen unter hyperglykämischen Bedingungen zeigt sich eine ähnliche Formation röhrenförmiger Strukturen wie unter normaler Glukosekonzentration. Die Funktion der koloniebildenden Zellen wird durch die MSCs wieder hergestellt. Neben den bereits erwähnten Integrinen spielen weitere Wachstumsfaktoren und Chemokine eine entscheidende Rolle im komplexen Prozess der Vaskulogenese. Vor allem die Zell-Zell-Interaktion scheint einen bedeutsamen Einfluss zu haben. MSCs sind gekennzeichnet durch eine hohe parakrine Funktion und setzen mehrere Faktoren unter anderem den proangiogenen VEGF frei (Lee, Huh, & Kang, 2022).

An dieser Stelle sollte nochmals auf die vermutlich mehr gebildeten extrazellulären Vesikel im Rahmen der Adipogenese verwiesen werden, über die die Zellen eine Möglichkeit zur Interaktion nutzen. Ebenso liefert die vermehrte Adhäsion Hinweise auf beeinflusste Membranproteine, zum Beispiel Integrine, die auch in der Koloniebildung eine Rolle spielen. Letztendlich ergänzen sich diese Erkenntnisse mit den Ergebnissen aus der aktuellen Studie hinsichtlich des Einflusses auf die Kolonienbildung der G-MSCs unter oxLDL. Trotz des schädlichen metabolischen Stimulus, Hyperglykämie bzw. oxLDL, besitzen die Stammzellen die Fähigkeit, Endotheldefekte zu beheben, vaskuläre Strukturen und Kolonien zu bilden. Mehr noch lässt sich ein aktivierender Reiz mit Verbesserung dieser Stammzellfunktion unter metabolischer Inflammation postulieren.

4.6 Initialer Proliferationsreiz und Induktion der Apoptose

Ein initialer kurzfristiger Entzündungsreiz wirkt induktiv auf die Proliferation und Populationsexpansion der G-MSCs. Anhand der Proliferationskurven ist ein Zeitintervall von bis zu 4 Tagen abzuleiten, anhand der CFU von bis zu 7 Tagen, in dem ein proinflammatorisches Milieu die Zellexpansion fördert. Unter andauernder Inflammation stagniert das Wachstum und durch die Aktivierung schädigender Pathomechanismen wird der Zelltod ausgelöst, sodass die Zellzahl schneller sinkt verglichen zur Kultivierung im Basismedium.

Aus einer Studie von Chu et al. wurden kongruente Erkenntnisse hinsichtlich der Induktion des Zelltods gewonnen. Diese Studie behandelt den Einfluss von oxLDL auf Stammzellen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden. OxLDL induziert in den Zellen dosisabhängig die Apoptose bei kombiniert vorliegender verminderter Zellproliferation durch Hemmung der Akt-(Proteinkinase B)-Phosphorylierung. Das Selbsterneuerungspotenzial, die endotheliale Differenzierung und die Expression vom Stammzellmarker OCT-4 wurde bereits nach 24 Stunden signifikant gehemmt (Chu, et al., 2011). Des Weiteren löst oxLDL in endothelialen Progenitorzellen eine Dysfunktion aus, wie oben bereits im Abschnitt 5.5 beschrieben. Die ROS-Produktion wird intensiviert und damit oxidativer Stress hervorgerufen. Akkumulierende freie Radikale schädigen sämtliche Biomoleküle einschließlich der Zellen. Ein Wirkmechanismus ist dabei die Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials. Dadurch wird über einen Anstieg von ROS und Expression der Cytochrom-C-Oxidase oxidativer Stress ausgelöst. Stark erhöhte Spiegel von ROS führen zu einer Aktivierung des Tumorsuppressors P53 sowie einer Translokation des antiapoptotischen Proteins Bax. Diese beiden Prozesse fördern die Apoptose der betroffenen Zellen (Yang, Mohamed, & Zhou, 2012).

Zusätzlich wird die Funktion der Zellen über eine Hemmung der eNOS-Proteinexpression beeinträchtigt. Resultat des oxidativen Stresses ist eine Blockade des PI3K/Akt/eNOS/NO-Stoffwechselweges. Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ist wiederum beteiligt an einer gestörten Differenzierung, Migration und Proliferation der Vorläuferzellen bei gleichzeitiger Induktion des Zelltodes (Ma, et al., 2006) (Yang, Mohamed, & Zhou, 2012) (Denu & Hematti, 2016). Die beobachtete Zellzahlabnahme ließe sich somit unter anderem auf eine oxLDL-induzierte Inhibition des PI3K/Akt/eNOS/NO-Signalweges zurückführen.

Die Apoptose-Induktion unter oxLDL bei multipotenten adulten Progenitorzellen spiegelt sich außerdem in einer erhöhten Konzentration der LDH (Laktatdehydrogenase) wider, die in das Medium freigesetzt wird. Darüber hinaus kann auch eine erhöhte Membranpermeabilität mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden. Antioxidantien, wie N-Acetylcystein, können die schädliche ROS-Produktion und die Hemmung der Akt-Phosphorylierung effektiv unterbinden. Eine vollständige Blockade des induzierten Zelltodes wird jedoch nicht erreicht. Im Gegensatz dazu kann der Zusatz des Gewebereparaturproteins MG53 vor einer Membranschädigung schützen und ließe sich potenziell in der Stammzelltherapie einsetzen mit dem Ziel, eine Verbesserung des Überlebens und der Proliferation zu erreichen (Lu, et al., 2010) (Li, et al., 2014) (Li, et al., 2020).

Während einer viralen bzw. bakteriellen Infektion werden eine Reihe Faktoren von reifen Immunzellen zur Bekämpfung von Pathogenen freigesetzt, zu denen unter anderem die dem Entzündungsmedium zugefügten Proteine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ zählen. Auf humane hämatopoetische Stammzellen kann IFN- γ verschiedene Effekte haben. Neben einer Induktion von Proliferation, Rekonstitution und Mobilisierung kann auch eine vermehrte Ausdifferenzierung resultieren. Dem gegenüber steht eine durch TNF- α und IFN- γ vermittelte Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion (Jahandideh, et al., 2020). Zudem zählen proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , zu den aktivierenden Stimuli von NF- κ B. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der bedeutsam im Rahmen der Regulation einer Immunantwort insbesondere in der Entstehung von Entzündungen, der Zellproliferation und des Zelltodes ist. Auch oxLDL generiert eine vermehrte Expression und Translokation von NF- κ B. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass oxLDL ebenfalls über Induktion von NF- κ B den Zelltod verursacht (Ji, et al., 2015).

Zur Erklärung des anfänglichen Proliferationsschubes lässt sich eine Studie von Zettler et al. anführen, in der humane Fibroblasten und glatte Muskelzellen mit einer Konzentration von 0, 10 oder 50 μ g/ml oxLDL über einen Zeitraum von 24-48 Stunden behandelt wurden. Die Analysen bestätigen eine Zunahme beider Zellzahlen unter Stimulation mit oxLDL. Als Ursache zeigen sich signifikante Erhöhungen Zellzyklus-regulierender Proteine, wie cyclinabhängige Kinasen. Diese Beobachtung könnte die Erklärung für die kontrollierte Proliferation im Rahmen der Atherosklerose sein. Unerwartet stellt sich in der Studie auch eine vermehrte Expression Zellzyklus-inhibierender Proteine dar, was vermutlich ebenfalls Auswirkungen auf die Proliferation im zeitlichen Verlauf der G-MSCs hat (Zettler, Prociuk, Austria, Massaeli, Zhong, & Pierce, 2003).

Des Weiteren sind Prozesse im Zellzyklus zum Teil abhängig von Sauerstoff, dessen Bildung unter anderem von oxLDL moduliert wird. Untersucht wurden humane Nabelvenen-Endothelzellen. Niedrige Konzentrationen bewirken eine Proliferation der Zellen, wohingegen bei steigender Konzentration des oxLDLs vermehrt die Apoptose induziert wird. Es wird dabei eine unterdrückte Expression des antiapoptotischen A20 Gens festgestellt, welches ein Zink-Finger-Protein codiert (Galle, Heinloth, Wanner, & Heermeier, 2001). Almalki et al. untersuchten die primären Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Die Ergebnisse zeigen unter anderem, dass eine Überexpression des HIF-1 α (Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 α) die Proliferation, das Überleben und die Aktivierung von Genen der Angiogenese fördert (Almalki & Agrawal, 2016). Ein entsprechender Induktor von HIF-1 α stellt zum Beispiel oxLDL dar. Die Akkumulation von HIF-1 α in Makrophagen durch oxLDL kann dann einen Einfluss auf die atherosklerotische Pathogenese haben (Shatrov, Sumbayev, Zhou, & Brüne, 2003). Abschließend betrachtet fördert oxLDL möglicherweise über HIF-1 α als Mediator das Wachstum der MSCs.

Die Expression der für Stammzellen spezifischen Transkriptionsfaktoren NANOG, SOX-2 und OCT-4 wird durch Entzündungsmedium und oxLDL in vitro tendenziell reduziert.

Die Pluripotenz beschreibt einen Zustand, in dem eine Zelle befähigt ist, sich so oft wie nötig selbst zu erneuern. Dieser Prozess bildet damit die Grundlage für die Gewebereparatur im gesunden und kranken Organismus (Allouba, ElGuindy, Krishnamoorthy, Yacoub, & Aguib, 2015). NANOG, SOX-2 und OCT-4 bezeichnen Schlüsselfaktoren der pluripotenten Differenzierung und der kontinuierlichen Selbsterneuerung von Stammzellen. Damit die Eigenschaften von Stammzellen aufrechterhalten werden können, interagieren die verschiedenen Faktoren miteinander, beeinflussen weitere Signalwege, verzögern die Seneszenz und bilden insgesamt ein komplexes regulatorisches Netzwerk (Pan & Thomson, 2007) (Orkin, et al., 2008). Eine Überexpression von NANOG in mesenchymalen Stammzellen fördert deren regeneratives Potenzial unter anderem parakrin im Bereich des Haarfollikels, das heißt durch die Sekretion bestimmter Moleküle. Diese Erkenntnisse deuten auf die mögliche Verwendung von MSCs mit NANOG-Überexpression in der Behandlung chronischer Erkrankungen, in diesem Beispiel einer Alopezie hin (Park, et al., 2019).

Die aktuell vorliegenden Ergebnisse bringen zum Ausdruck, dass eine Inflammation im Körper, charakterisiert durch proinflammatorische Zytokine bzw. oxLDL, inhibitorisch auf die Transkriptionsfaktoren NANOG, SOX-2 und OCT-4 wirkt. Die bereits oben beschriebenen Publikationen von Chu et al. (Chu, et al., 2011) und Lu et al. (Lu, et al., 2010) bekräftigen die Aussage durch eine signifikante Erniedrigung des exprimierten OCT-4 im Rahmen der Behandlung mit oxLDL. Damit besteht ein inhibiertes Potenzial zur Selbsterneuerung der Stammzellen und folglich zur Regeneration im Gegensatz zur geförderten Ausdifferenzierung in eine spezialisierte Zelllinie.

MSCs haben ein ausgesprochen hohes therapeutisches Potenzial, welches aktuell nicht vollständig ausgenutzt wird. Ursache dafür ist zudem eine vermehrte Alterung und Seneszenz während der Kulturexpansion ex vivo, die mit oxidativem Stress einhergehen. Dies resultiert in einer gestörten in vivo-Funktion und einem behinderten Engrafting der Stammzellen. Darüber hinaus lässt sich aus dieser Erkenntnis ableiten, dass auch ohne explizite oxLDL-Stimulation mit oxidativem Stress gerechnet werden muss, was letztlich auch Einfluss auf die Auswertung der Ergebnisse hat. Ein großes Bestreben besteht daher darin, eine Optimierung des ROS-Spiegels zu bewirken. Auf diese Weise können die Immunmodulation und die regenerativen Fähigkeiten der MSCs mit dem Ziel, Stammzellen in der Therapie von Erkrankungen zu etablieren, verbessert werden (Denu & Hematti, 2016).

5. Zusammenfassung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind global betrachtet die Krankheiten mit der höchsten Morbidität und Mortalität, wobei die chronisch entzündliche Atherosklerose den größten Anteil ausmacht. Kennzeichnend für die Atherosklerose sind Lipidablagerungen in der arteriellen Wandung. Ausgehend von einer endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer Obstruktion des Gefäßes durch Bildung von Plaques und Thromben. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Oxidation des Low Density Lipoproteins (LDL) zu oxidiertem LDL.

Das oxLDL wird mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht, dabei unter anderem mit Adipositas und dem durch Adipositas induzierten Entzündungszustand des Fettgewebes. Neben verschiedenen Pathogenen und autoimmunen Prozessen sind auch chronischer Stress, Über- und Fehlernährung ursächlich für eine chronische Entzündung. Diese spezielle Form der Entzündung wird als metabolische Inflammation bezeichnet. Typische Folge sind Typ 2 Diabetes, Fettstoffwechselstörungen sowie kardiovaskuläre Erkrankungen und Atherosklerose. Auch Krankheiten wie rheumatoide Arthritis, chronische Darmentzündung und zystische Fibrose, die durch einen permanenten Entzündungszustand charakterisiert sind, sind mit einer metabolischen Dysfunktion assoziiert. Insgesamt wird die Entzündung des Fettgewebes als förderlich für eine systemische Inflammation im Organismus angesehen.

Die aufgeführten „lifestyle“-Faktoren, Ernährung und Stress, aber auch Rauchen und ein Typ 2 Diabetes beeinflussen neben der Genetik die Entstehung einer irreversiblen Parodontitis. Die Parodontitis bezeichnet eine chronisch destruktive Entzündung des Zahnhalteapparates, der sich zusammensetzt aus der Gingiva, dem Cementum, dem Os alveolare und der Periodontalligamente. Als Ursache sind vor allem Bakterien auf der Zahnoberfläche anzusehen.

Der therapeutische Fokus liegt bei der Parodontitis insbesondere in der anatomischen und funktionellen Regeneration des zerstörten Gewebes. Eine Möglichkeit der parodontalen Regeneration stellt der Einsatz mesenchymaler Stammzellen zum Wiederaufbau des Gewebes dar, die durch zwei Funktionen gekennzeichnet sind: Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedenen spezialisierte Zelllinien. Für diese Zellen wurden minimale Kriterien vom Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee der International Society for Cellular Therapy definiert. Dazu zählen die Proliferation unter Standardkulturbedingungen, die Kolonienbildung, eine multipotente Differenzierung und die Expression bestimmter Oberflächenproteine.

Ursprungsgewebe für die Isolation multipotenter adulter Stammzellen im Gegensatz zu pluripotenten embryonalen Stammzellen stellen unter anderem dentale Gewebe dar, zum Beispiel die adulte Gingiva.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von oxLDL im Rahmen einer metabolischen Inflammation im Vergleich zur klassisch zytokinvermittelten Entzündungsreaktion auf die gingivalen Stammzellen zu untersuchen. Auf diese Weise ließ sich dann die Bedeutung der Atherosklerose für die Parodontitis bzw. die parodontale Regeneration evaluieren.

Die Stichprobe bestand aus fünf teilweise impaktierten Weisheitszähnen. Der chirurgisch extrahierte Gingivarand stellte das Ursprungsgewebe für die isolierten mesenchymalen Stammzellen dar. Diese erwiesen sich als adhärent an der Kulturplastik, exprimierten gemäß der Durchflusszytometrie repräsentative Oberflächenmarker und bildeten typische Kolonien. In der multilineären Differenzierung zeigten die G-MSCs unter Behandlung mit oxLDL eine vermehrte Matrixkalzifizierung und Synthese intrazellulärer Fettvakuolen als Hinweise auf eine verstärkte osteogene und adipogene Ausdifferenzierung der Stammzellen. Ein signifikanter Einfluss auf die entsprechende Genexpression konnte nicht eruiert werden. Vergleichbar damit bestand eine leicht förderliche Wirkung von oxLDL auf die Expression von Aggrecan im Rahmen der chondrogenen Differenzierung. Die verhältnismäßig stärkere Färbung gegenüber dem Entzündungsmedium konnte zusätzlich als Anreiz zur Proliferation und osteochondrogenen Transformation unter oxLDL bewertet werden.

Die weiteren Analysen belegen eine gehemmte Funktionalität mit Einschränkungen im Bereich der Selbsterneuerung und Pluripotenz der G-MSCs unter metabolischer Inflammation. Unter anderem fiel eine Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren NANOG, SOX-2 und OCT-4 auf. Bemerkenswert war die gestärkte Adhäsion der Zellen an der Unterlage, die im physiologischen Zustand und Ausmaß eine charakteristische Eigenschaft von MSCs beschreibt.

Ein weiteres bedeutsames Resultat war der initiale Proliferationsreiz von wenigen Tagen und die sich anschließende Hemmung der Zellexpansion im entzündlichen Milieu. Abschließend konnte eine vermehrte Apoptose unter andauernder Stimulation generiert werden. Darüber hinaus sind eine Zellschädigung und eine Induktion des Zelltodes durch oxLDL auch im Rahmen der Differenzierung zu berücksichtigen.

Diese Arbeit zeigt, dass oxLDL hinderlich jedoch weniger schädigend im Vergleich zu einer zytokinabhängigen Inflammation auf MSCs wirkt. Es steht in Assoziation zum oxidativen Stress und repräsentiert einen entscheidenden Faktor mit negativem Einfluss auf die atherosklerotische Pathogenese, zum Beispiel in Hinblick auf eine verstärkte osteochondrogene Transformation. Darüber hinaus gilt es die vermehrte Matrixkalzifizierung mit gegebenenfalls auch einer ektopen Kalzifikation zu berücksichtigen, die ursächlich für eine Karies und nachfolgend eine parodontale Entzündung ist. Ausschlaggebend ist zudem die Inhibition stammzellspezifischer Charakteristika durch Behandlung mit oxLDL. Zugunsten einer vermehrten Differenzierung wird das Potenzial zur Selbsterneuerung vermindert. Der Einsatz von Stammzellen als zukünftige Therapiealternative bei der parodontalen Regeneration wird damit eingeschränkt.

Global betrachtet ergibt sich eine negative Korrelation von kardiovaskulären Erkrankungen, wie der Atherosklerose, und entzündlichen Prozessen, wie einer Parodontitis. Vermittelt über oxLDL und eine metabolische Inflammation im Organismus werden verschiedene pathologische Prozesse initiiert, wobei die Gewebereparatur und insgesamt die Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen eine besondere Stellung einnehmen. Als Konsequenz kann von einem gesellschaftlich relevanten Problem gesprochen werden. Erhöhte Konzentrationen von oxLDL im Serum eines Patienten werden zunehmend diagnostiziert, stellen damit keinen Einzelfall mehr dar und müssen demzufolge in der individuellen Therapie bei anderen Erkrankungen berücksichtigt und behandelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Ackers, I., Szymanski, C., Silver, M., & Malgor, R. (19. November 2020). Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces WNT5A Signaling Activation in THP-1 Derived Macrophages and a Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Line . *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, Vol. 7, S. 567837.
- Ahmadmehrabi, S., & Tang, W. (November 2017). Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases . *Current Opinion in Cardiology*, Vol. 32 No. 6, S. 761-766.
- Alexandridi, F., Tsantila, S., & Pepelassi, E. (Juni 2018). Smoking cessation and response to periodontal treatment. *Australian Dental Journal*, Vol. 63, No. 2, S. 140-149.
- Allouba, M., ElGuindy, A., Krishnamoorthy, N., Yacoub, M., & Aguib, Y. (15. Oktober 2015). Nanog: A pluripotency homeobox (master) molecule . *Global Cardiology Science & Practice*, Vol. 2015, No. 3, S. 36.
- Almalki, S., & Agrawal, D. (Juli-August 2016). Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Differentiation*, Vol. 92, No. 1-2 , S. 41-51.
- Almeida, A., Fagundes, N., Maia, L., & Lima, R. (2018). Is there an Association Between Periodontitis and Atherosclerosis in Adults? A Systematic Review . *Current Vascular Pharmacology*, Vol. 16, No. 6, S. 569-582.
- Amling, M., & Delling, G. (September 1996). [Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption]. *Der Pathologe*, Vol. 17, No. 5, S. 358-367.
- Bán, A., Németh, Z., Szauter, A., Soós, S., & Balaskó, M. (Mai 2018). [Prevalence and severity of chronic parodontitis and oral mucosal lesions in chronic obstructive lung disease]. *Orvosi hetilap*, Vol. 158, No. 21, S. 831-836.
- Bekkering, S., Quintin, J., Joosten, L., van der Meer, J., Netea, M., & Riksen, N. (August 2014). Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol. 34, No. 8, S. 1731-1738.
- Botelho, J., Machado, V., Mascarenhas, P., Rua, J., Alves, R., Cavacas, M., et al. (Dezember 2018). Stress, salivary cortisol and periodontitis: A systematic review and meta-analysis of observational studies . *Archives of Oral Biology*, Vol. 96, S. 58-65.
- Brennan, K., Martin, K., FitzGerald, S., O'Sullivan, J., Wu, Y., Blanco, A., et al. (2020). A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*, Vol. 10, S. 1039.
- Calvo-Iglesias, J., Pérez-Estévez, D., Lorenzo-Abalde, S., Sánchez-Correa, B., Quiroga, M., Fuentes, J., et al. (2016). Characterization of a Monoclonal Antibody Directed against Mytilus spp Larvae Reveals an Antigen Involved in Shell Biomineralization. *Public Library of Science (PLOS) ONE*, Vol. 11, No. 3, S. e0152210.

- Cao, C., Ji, X., Luo, X., & Zhong, L. (2015). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* promote the transformation and proliferation of vascular smooth muscle cell phenotypes. *International journal of clinical and experimental medicine*, Vol. 8 No. 10, S. 18327-18334.
- Chen, F. (9. Oktober 2017). [Periodontal tissue engineering and regeneration] . *Chinese journal of stomatology*, Vol. 52, No. 10, S. 610-614.
- Chen, H., Li, Z., Dong, L., Wu, Y., Shen, H., & Chen, Z. (13. Mai 2019). Lipid metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, Vol. 14, S. 1009-1018.
- Choi, H., Han, K., Park, Y.-G., & Park, J.-B. (Juli 2015). Associations Among Oral Hygiene Behavior and Hypertension Prevalence and Control: The 2008 to 2010 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Periodontology*, Vol. 86 No. 7, S. 866-873.
- Chu, L., Hao, H., Luo, M., Huang, Y., Chen, Z., Lu, T., et al. (Februar 2011). Ox-LDL modifies the behaviour of bone marrow stem cells and impairs their endothelial differentiation via inhibition of Akt phosphorylation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 15, No. 2, S. 423-432.
- Cinoku, I., Mavragani, C., & Moutsopoulos, H. (Februar 2020). Atherosclerosis: Beyond the lipid storage hypothesis. The role of autoimmunity . *European Journal of Clinical Investigation*, Vol. 50, No. 2, S. e13195.
- Coelho, J., Miranda, S., da Cruz, S., Trindade, S., Passos-Soares, J., Cerqueira, E. d., et al. (Juli 2020). Is there association between stress and periodontitis? . *Clinical Oral Investigations*, Vol. 24, No. 7, S. 2285-2294.
- Corbella, S., Taschieri, S., Del Fabbro, M., Francetti, L., Weinstein, R., & Ferrazzi, E. (März 2016). Adverse pregnancy outcomes and periodontitis: A systematic review and meta-analysis exploring potential association . *Quintessence International*, Vol. 47, No. 3, S. 193-204.
- Czerniuk, M., Stanisław Surma, S., Romańczyk, M., Nowak, J., Wojtowicz, A., & Filipiak, K. (Februar 2022). Unexpected Relationships: Periodontal Diseases: Atherosclerosis–Plaque Destabilization? From the Teeth to a Coronary Event. *Biology (Basel)*, Vol. 11 No. 2, S. 272.
- D'Aiuto, F., Gkraniias, N., Bhowruth, D., Khan, T., Orlandi, M., Suvan, J., et al. (Dezember 2018). Systemic effects of periodontitis treatment in patients with type 2 diabetes: a 12 month, single-centre, investigator-masked, randomised trial . *Lancet Diabetes & Endocrinology*, Vol. 6 No. 12, S. 954-965.
- Dawodu, D., Patecki, M., Dumler, I., Haller, H., & Kiyani, Y. (Juni 2019). oxLDL inhibits differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts via the CD36 mediated suppression of Wnt signaling pathway. *Molecular Biology Reports*, Vol.46, No.3, S. 3487-3496.
- Dawodu, D., Patecki, M., Hegermann, J., Dumler, I., Haller, H., & Kiyani, Y. (2018). oxLDL inhibits differentiation and functional activity of osteoclasts via scavenger receptor-A mediated autophagy and cathepsin K secretion. *Scientific Reports*, Vol. 8, S. 11604.

- Dentino, A., Lee, S., Mailhot, J., & Hefti, A. (Februar 2013). Principles of periodontology. *Periodontology 2000, Vol. 61, No. 1, S. 16-53.*
- Denu, R., & Hematti, P. (2016). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Vol. 2016, S. 2989076.*
- Di Pietro, N., Formoso, G., & Pandolfi, A. (September 2016). Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology, Vol. 84, S. 1-7.*
- Di Santo, S., Diehm, N., Ortmann, J., Völzmann, J., Yang, Z., Keo, H.-H., et al. (5. September 2008). Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cell function by downregulation of E-selectin and integrin $\alpha\beta 5$. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 373, No. 4, S. 528-532.*
- Ding, D., Shyu, W., & Lin, S. (2011). Mesenchymal stem cells . *Cell Transplantation, Vol. 20, No. 1, S. 5-14.*
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy, vol. 8, no. 4, S. 315-317.*
- Dorn, B., Dunn, W., & Progulski-Fox, A. (November 1999). Invasion of Human Coronary Artery Cells by Periodontal Pathogens. *Infection and Immunity, Vol. 67 No. 11, S. 5792-5798.*
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica, Vol. 62, No. 3, S. 329-337.*
- Eisenstecken, E., Gostner, J., Fuchs, D., & Überall, F. (2012). Molekulare Stoffwechselsensorik bei durch Adipositas induzierte Entzündung. *Schweizerische Zeitung für Ganzheitsmedizin, Vol. 24, S. 221-231.*
- Eke, P., Borgnakke, W., & Genco, R. (Februar 2020). Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA . *Periodontology 2000, Vol. 82, No. 1, S. 257-267.*
- Falk, E. (18. April 2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology, Vol. 47, No. 8, S. C7-12.*
- Farrokhi, E., Samani, K., Hashemzadeh, M., & Tabatabaiefar, M. (Juli 2015). Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on the Expression of Runx2 and SPARC Genes in Vascular Smooth Muscle Cells. *Iranian Biomedical Journal, Vol. 19, No. 3, S. 160-164.*
- Fawzy El-Sayed, K. M., Paris, S., Graetz, C., Kassem, N., Mekhemar, M., Ungefroren, H., et al. (2015). Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS+ and MACS- cell populations. *International Journal of Oral Science, vol. 7, no. 2, S. 80-88.*
- Fawzy El-Sayed, K., & Dörfer, C. (2016). Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells International, Vol. 2016, S. 7154327.*

- Febbraio, M., Roy, C., & Levin, L. (Februar 2022). Is There a Causal Link Between Periodontitis and Cardiovascular Disease? A Concise Review of Recent Findings. *International Dental Journal*, Vol. 72, No. 1, S. 37-51.
- Foster, B. (August 2017). On the discovery of cementum. *Journal of Periodontal Research*, Vol. 52, No. 4, S. 666-685.
- Foulquier, S., Daskalopoulos, E., Lluri, G., Hermans, K., Deb, A., & Blankesteyjn, W. (Januar 2018). WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacological Reviews*, Vol. 70, No. 1, S. 68-141.
- Frostegård, J. (August 2002). Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease . *Autoimmunity Reviews*, Vol. 1, No. 4, S. 233-237.
- Fuster, J., Zuriaga, M., Thi-Minh Ngo, D., Farb, M., Arahamian, T., Yamaguchi, T., et al. (April 2015). Noncanonical Wnt Signaling Promotes Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysfunction Independent of Adipose Tissue Expansion. *Diabetes*, Vol. 64, No. 4, S. 1235-1248.
- Galle, J., Heinloth, A., Wanner, C., & Heermeier, K. (Februar 2001). Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney International Supplements*, Vol. 78, S. 120-123.
- Gängler, P., Hoffmann, T., Willershausen, B., Schwenzer, N., & Ehrenfeld, M. (2005). *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, Seiten 47 ff.* . Stuttgart - New York : Georg Thieme Verlag.
- Gao, F., Chiu, S., Motan, D., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H., et al. (Januar 2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*, Vol. 7, No. 1, S. e2062.
- Gao, X., Zhang, L., Gu, G., Wu, P., Jin, S., Hu, W., et al. (März 2015). The effect of oxLDL on aortic valve calcification via the Wnt/ β -catenin signaling pathway: an important molecular mechanism . *Journal of heart valve disease*, Vol. 24, No. 2, S. 190-196.
- Gasner, N., & Schure, R. (2020). *Periodontal Disease*. Abgerufen am 24. Januar 2021 von StatPearls: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/>
- Gavriilidou, N., & Belibasakis, G. (Dezember 2019). Root caries: the intersection between periodontal disease and dental caries in the course of ageing. *British Dental Journal*, Vol. 227, No. 12, S. 1063-1067.
- Genco, R., Graziani, F., & Hasturk, H. (Juni 2020). Effects of periodontal disease on glycemic control, complications, and incidence of diabetes mellitus . *Periodontology 2000*, Vol. 83, No. 1, S. 59-65.
- Geovanini, G., & Libby, P. (21. Juni 2018). Atherosclerosis and inflammation: overview and updates . *Clinical Science*, Vol. 132, No. 12, S. 1243-1252.

- Gianos, E., Jackson, E., Tejpal, A., Aspary, K., O'Keefe, J., Aggarwal, M., et al. (7. September 2021). Oral health and atherosclerotic cardiovascular disease: A review. *American Journal of Preventive Cardiology*.
- Gomes-Filho, I., da Cruz, S., Trindade, S., Passos-Soares, J., Carvalho-Filho, P., Figueiredo, A., et al. (März 2020). Periodontitis and respiratory diseases: A systematic review with meta-analysis. *Oral Diseases*, Vol. 26, No. 2, S. 439-446.
- Goodson, J. (Oktober 2020). Disease reciprocity between gingivitis and obesity. *Journal of Periodontology*, Vol. 91, No. 1, S. 26-34.
- Grawish, M. (26. September 2018). Gingival-derived mesenchymal stem cells: An endless resource for regenerative dentistry. *World Journal of Stem Cells*, Vol. 10, No. 9, S. 116-118.
- Gressner, A. M., & Arndt, T. (2019). *Lexikon de Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 3. Auflage, Seiten 1479-1480. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Gressner, A., & Arndt, T. (2019). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, S.735. Berlin: Springer.
- Haase, R. (2006). *Knochenstoffwechsel – Risikofaktor für Parodontitis marginalis & Zahnverlust?* Abgerufen am 21. März 2021 von Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald : https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/252/file/diss_haase_romy.pdf
- Hajishengallis, G. (Januar 2014). Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends in Immunology*, Vol. 35, No 1, S. 3-11.
- Hamel, P., Abed, E., Brissette, L., & Moreau, R. (April 2008). Characterization of oxidized low-density lipoprotein-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol. 294, No. 4, S. 1021-1033.
- Hartmann, C., & Tabin, C. (Juli 2000). Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, Vol. 127, No. 14, S. 3141-3159.
- Hauck, A., Huang, Y., Hertz, A., & Bernlohr, D. (25. Januar 2019). Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 294, No. 4, S. 1083-1088.
- Hernández-Monjaraz, B., Santiago-Osorio, E., Monroy-García, A., Ledesma-Martínez, E., & Mendoza-Núñez, V. (April 2018). Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, No. 4, S. 944.
- Hickey, N., Shalamanova, L., Whitehead, K., Dempsey-Hibbert, N., van der Gast, C., & Taylor, R. (Februar 2020). Exploring the putative interactions between chronic kidney disease and chronic periodontitis. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 46, No. 1, S. 61-77.
- Holde, G., Oscarson, N., Trovik, T., Tillberg, A., & Jönsson, B. (Oktober 2017). Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *Journal of Periodontology*, Vol. 88, No. 10, S. 1012-1022.

- Hong, R., Wang, Z., Sui, A., Liu, X., Fan, C., Lipkind, S., et al. (Februar 2019). Gingival mesenchymal stem cells attenuate pro-inflammatory macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and modulate lipid metabolism. *Archives of Oral Biology*, Vol. 98, S. 92-98.
- Hotamisligil, G. (19. September 2017). Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. *Immunity*, Vol. 47 No. 3, S. 406-420.
- Ishii, T., Itoh, K., Sato, H., & Bannai, S. (Oktober 1999). Oxidative stress-inducible proteins in macrophages . *Free Radical Research*, Vol. 31, No. 4, S. 351-355.
- Iwasaki, M., Manz, M., Moynihan, P., Yoshihara, A., Muramatsu, K., Watanabe, R., et al. (Juli 2011). Relationship between saturated fatty acids and periodontal disease . *Journal of Dental Research*, Vol. 90 No. 7, S. 861-867.
- Iyer, A., Fairlie, D., Prins, J., Hammock, B., & L., B. (Februar 2010). Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity, Vol. 6, No. 2. *Nature Reviews Endocrinology*, S. 71-82.
- Jaedicke, K., Bissett, S., Finch, T., Thornton, J., & Preshaw, P. (Februar 2019). Exploring changes in oral hygiene behaviour in patients with diabetes and periodontal disease: A feasibility study. *International Journal of Dental Hygiene*, Vol. 17, No. 1, S. 55-63.
- Jahandideh, B., Derakhshani, M., Abbaszadeh, H., Movassaghpour, A., Mehdizadeh, A., Talebi, M., et al. (Mai 2020). The pro-inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells . *Human Immunology*, Vol. 81, No. 5, S. 206-217.
- Jayaraman, S., Baveghems, C., Chavez, O., Rivas-Urbina, A., Sánchez-Quesada, J., & Gursky, O. (Juli 2019). Effects of triacylglycerol on the structural remodeling of human plasma very low- and low-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol. 1864, No. 7, S. 1061-1071.
- Ji, K., Qian, L., Nan, J., Xue, Y., Zhang, S., Wang, G., et al. (2015). Ox-LDL Induces Dysfunction of Endothelial Progenitor Cells via Activation of NF- κ B. *BioMed Research International*, Vol. 2015, S. 175291.
- Jiang, N., Guo, W., Chen, M., Zheng, Y., Zhou, J., Kim, S., et al. (2016). Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement . *Frontiers of Oral Biology*, Vol. 18, No. 1, S. 1-8.
- Johnson, G., & Hill, M. (Februar 2004). Cigarette smoking and the periodontal patient. *Journal of Periodontology*, Vol. 75, No. 2, S. 196-209.
- Kapellas, K., Singh, A., Bertotti, M., Nascimento, G., Jamieson, L., & collaboration, P.-C. (Februar 2019). Periodontal and chronic kidney disease association: A systematic review and meta-analysis . *Nephrology (Carlton)*, Vol. 24, No. 2, S. 202-212.
- Kassebaum, N., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C., & Marcenes, W. (November 2014). Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010, A Systematic Review and Meta-regression. *Journal of Dental Research*, Vol. 93, No. 11, S. 1045-1053.

- Kattoor, A., Goel, A., & Mehta, J. (Juli 2019). LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)*, Vol. 8, No. 7, S. 218.
- Kattoor, A., Kanuri, S., & Mehta, J. (2019). Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis. *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 26, No. 9, S. 1693-1700.
- Kattoor, A., Pothineni, N., Palagiri, D., & Mehta, J. (18. September 2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, Vol. 19, No. 11, S. 42.
- Keller, A., Rohde, J., Raymond, K., & Heitmann, B. (Juni 2015). Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review . *Journal of Periodontology*, Vol. 86, No. 6, S. 766-776.
- Keshtkar, S., Azarpira, N., & Ghahremani, M. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, Vol. 9, S. 63.
- Khader, Y. S., Bawadi, H., Haroun, T., Alomari, M., & Tayyem, R. (Januar 2009). The association between periodontal disease and obesity among adults in Jordan. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 36 No. 1, S. 18-24.
- Kim, H.-J., Cha, G., Kim, H.-J., Kwon, E.-Y., Lee, J.-Y., Choi, J., et al. (Februar 2018). Porphyromonas gingivalis accelerates atherosclerosis through oxidation of high-density lipoprotein. *Journal of Periodontal & Implant Science*, Vol 48, No. 1, S. 60-68.
- Kim, S.-M., Huh, J.-W., Kim, E.-Y., Shin, M.-K., Park, J.-E., Kim, S., et al. (Februar 2019). Endothelial dysfunction induces atherosclerosis: increased aggrecan expression promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *BMB reports*, Vol. 52, No. 2, S. 145-150.
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, Vol. 85, No. 1, S. 3-10.
- Komori, T. (29. Februar 2020). Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Molecular Cell*, Vol. 43, No. 2, S. 168-175.
- Kondo, T., Nakano, Y., Adachi, S., & Murohara, T. (25. September 2019). Effects of Tobacco Smoking on Cardiovascular Disease . *Circulation Journal*, Vol. 83, No. 10, S. 1980-1985.
- Könönen, E., Gursoy, M., & Gursoy, U. (August 2019). Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *Journal of Clinical Medicine*, Vol. 8, No. 8, S. 1135.
- Kuzu, O., Noory, M., & Robertson, G. (15. April 2016). The role of cholesterol in cancer. *Cancer Research*, Vol. 76, No. 8, S. 2063-2070.
- Lang, N., & Schätzle, M. L. (Juli 2009). Gingivitis as a risk factor in periodontal disease . *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 36, No. 10, S. 3-8.
- Laudes, M. (7. März 2011). Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 46, No.2, S. 65-72.

- Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V., & Santiago-Osorio, E. (16. August 2019). Mesenchymal Stem Cells for Periodontal Tissue Regeneration in Elderly Patients . *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, Vol. 74, No. 9, S. 1351-1358.
- Lee, H., Huh, Y.-H., & Kang, K.-T. (April 2022). Mesenchymal Stem Cells Potentiate the Vasculogenic Capacity of Endothelial Colony-Forming Cells under Hyperglycemic Conditions. *Life (Basel)*, Vol. 12, No. 4, S. 469.
- Leiva, E., Wehinger, S., Guzmán, L., & Orrego, R. (17. September 2015). *Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis*. Abgerufen am 22. Januar 2021 von IntechOpen: <https://www.intechopen.com/books/hypercholesterolemia/role-of-oxidized-ldl-in-atherosclerosis>
- Lertpimonchai, A., Rattanasiri, S., Arj-Ong Vallibhakara, S., Attia, J., & Thakkinstian, A. (Dezember 2017). The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *International Dental Journal*, Vol. 67, No. 6, S. 332-343.
- Lertpimonchai, A., Rattanasiri, S., Tamsailom, S., Champaiboon, C., Ingsathit, A., Kitiyakara, C. L., et al. (Januar 2019). Periodontitis as the risk factor of chronic kidney disease: Mediation analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 46, No. 6, S. 631-639.
- Li, A., Thomas, R., van der Sluis, L., Tjakkes, G.-H., & Slot, D. (November 2020). Definitions used for a healthy periodontium-A systematic review . *International Journal of Dental Hygiene*, Vol. 18, No. 4, S. 327-343.
- Li, G., Yu, H., Liu, N., Zhang, P., Tang, Y., Hu, Y., et al. (8. Mai 2019). Overexpression of CX3CR1 in Adipose-Derived Stem Cells Promotes Cell Migration and Functional Recovery After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Frontiers in Neuroscience*, Vol. 13, S. 462.
- Li, X., Jiang, M., Tan, T., Narasimhulu, C., Xiao, Y., Hao, H., et al. (Januar 2020). N-acetylcysteine prevents oxidized low-density lipoprotein-induced reduction of MG53 and enhances MG53 protective effect on bone marrow stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 24, No. 1, S. 886-898.
- Li, X., Xiao, Y., Cui, Y., Tan, T., Narasimhulu, C., Hao, H., et al. (Dezember 2014). Cell membrane damage is involved in the impaired survival of bone marrow stem cells by oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 18, No. 12, S. 2445-2453.
- Liccardo, D., Cannavo, A., Spagnuolo, G., Ferrara, N., Cittadini, A., Rengo, C., et al. (März 2019). Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, No. 6, S. 1414.
- Lii, C.-K. L.-P., Yao, H.-T., Hsieh, Y.-S., Tsai, C.-W., Liu, K.-L., & Chen, H.-W. (2. März 2010). Chrysanthemum morifolium Ramat. reduces the oxidized LDL-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells . *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 128, No. 1, S. 213-220.

- Lin, F.-Y., Tsao, N.-W., Shih, C.-M., Lin, Y.-W., Yeh, J.-S., Chen, J.-W., et al. (2015). The Biphasic Effects of Oxidized-Low Density Lipoprotein on the Vasculogenic Function of Endothelial Progenitor Cells. *Public Library of Science (PLOS) one*, Vol. 10, No. 5, S. e0123971.
- Liu, H., & Jiang, D. (11. Juni 2011). Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 412, No. 13-14, S. 1180-1186.
- Liu, J., Ruan, J., Weir, M., Ren, K., Schneider, A., Wang, P., et al. (Juni 2019). Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*, Vol. 8, No. 6, S. 537.
- Liu, L., Liu, Z., Chen, H., Zhang, G., Kong, Y., & Kang, X. (Dezember 2011). Oxidized low-density lipoprotein and β -glycerophosphate synergistically induce endothelial progenitor cell ossification. *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol.32, No.12, S. 1491-1497.
- Liu, X., Wang, Z., Song, W., Sun, W., Hong, R., Pothukuchi, A., et al. (Januar 2020). Systematically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells regulate lipid metabolism and inflammation in hyperlipidemic mice with periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, Vol. 19, No. 1, S. 672-682.
- Lopes-Virella, M., Baker, N., Hunt, K., Lachin, J., Nathan, D., & Virella, G. (Februar 2011). Oxidized LDL Immune Complexes and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes. *Atherosclerosis*, Vol. 214, No. 2, S. 462-467.
- Lu, T., Parthasarathy, S., Hao, H., Luo, M., Ahmed, S., Zhu, J., et al. (15. Dezember 2010). Reactive Oxygen Species Mediate Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Inhibition of Oct-4 Expression and Endothelial Differentiation of Bone Marrow Stem Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. 13, No. 12, S. 1845-1856.
- Lula, E., Ribeiro, C., Hugo, F., Alves, C., & Silva, A. (Oktober 2014). Added sugars and periodontal disease in young adults: an analysis of NHANES III data . *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 100 No. 4, S. 1182-1187.
- Ma, F., Zhou, B., Chen, Z., Ren, Q., Lu, S., Sawamura, T., et al. (Juni 2006). Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Lipid Research*, Vol. 47, No. 6, S. 1227-1237.
- Ma, F.-X., Chen, F., Ren, Q., & Han, Z.-C. (Mai 2009). Lovastatin restores the function of endothelial progenitor cells damaged by oxLDL. *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 30, No. 5, S. 545-552.
- Mahmut, A., Boulanger, M., Fournier, D., Couture, C., Trahan, S., Pagé, S., et al. (Juni 2013). Lipoprotein lipase in aortic valve stenosis is associated with lipid retention and remodelling . *European Journal of Clinical*, Vol. 43, No. 6, S. 570-578.
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K., & Wang, H.-L. (August 2003). Influence of sex hormones on the periodontium . *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 30, No. 8, S. 671-681.
- Michaud, D., Fu, Z., Shi, J., & Chung, M. (1. Januar 2017). Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiologic Reviews*, Vol. 39, No. 1, S. 49-58.

- Möbius, R. (2016). Die parodontale Therapie ist überholt und braucht ein Update. *Zahnarzt Wirtschaft Praxis*, Vol. 5, 98-101.
- Mohammed, M., Sendra, S., Lloret, J., & Bosch, I. (1. Februar 2018). *Systems and WBANs for Controlling Obesity*. Abgerufen am 18. Januar 2021 von Journal of Healthcare Engineering: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5823412/>
- Munir, H., Ward, L., & McGettrick, H. (2018). Mesenchymal Stem Cells as Endogenous Regulators of Inflammation . *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 1060, S. 73-98.
- Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., & Sukanuma, N. (September 2019). Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications . *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 76, No. 17, S. 3323-3348.
- Nanci, A., & Bosshardt, D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, Vol. 40, No. 1, S. 11-28.
- Nascimento, G., Leite, F., Vestergaard, P., Scheutz, F., & López, R. (Juli 2018). Does diabetes increase the risk of periodontitis? A systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies . *Acta Diabetologica*, Vol. 55, No. 7, S. 653-667.
- Nascimento, P., Castro, M., Magno, M., Almeida, A., Fagundes, N., Maia, L., et al. (2019). Association Between Periodontitis and Cognitive Impairment in Adults: A Systematic Review . *Frontiers in Neurology*, Vol. 10, S. 323.
- Nazir, M. (April - Juni 2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, Vol. 11, No. 2, S. 72-80.
- Nicholson, A., Febbraio, M., Han, J., Silverstein, R., & Hajjar, D. (Mai 2000). CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor . *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 902, S. 128-131.
- Nuñez, J., Vignoletti, F., Caffesse, R., & Sanz, M. (Februar 2019). Cellular therapy in periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, Vol. 79, No. 1, S. 107-116.
- Nwizu, N., Wactawski-Wende, J., & Genco, R. (Juni 2020). Periodontal disease and cancer: Epidemiologic studies and possible mechanisms. *Periodontology 2000*, Vol. 83, No. 1, S. 213-233.
- Orkin, S., Wang, J., Kim, J., Chu, J., Rao, S., Theunissen, T., et al. (2008). The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells . *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 73, S. 195-202.
- Ouanounou, A. (Mai 2016). Xerostomia in the Geriatric Patient: Causes, Oral Manifestations, and Treatment. *Compendium of continuing education in dentistry*, Vol. 37, No. 5, S. 306-311.
- Pan, G., & Thomson, J. (Januar 2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, Vol. 17, No. 1, S. 42-49.

- Paone, S., Baxter, A., Hulett, M., & Poon, I. (März 2019). Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis . *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 76, No. 6, S. 1093-1106.
- Parhami, F., Jackson, S., Tintut, Y., Le, V., Balucan, J., Territo, M., et al. (Dezember 1999). Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 14, No. 12, S. 2067-2078.
- Park, J., Jun, E., Son, D., Hong, W., Jang, J., Yun, W., et al. (4. Juli 2019). Overexpression of Nanog in amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates dermal papilla cell activity and promotes hair follicle regeneration . *Experimental & Molecular Medicine*, Vol. 51, No. 7, S. 1-15.
- Pedroso, J., Lotfollahi, Z., Albattarni, G., Schulz, M., Monteiro, A., Sehnem, A., et al. (6. November 2019). Influence of Periodontal Disease on cardiovascular markers in Diabetes Mellitus patients. *Scientific Reports*, Vol. 9, No. 1, S. 16138.
- Perfetto, S., Chattopadhyay, P., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R., et al. (Juli 2010). Amine-reactive dyes for dead cell discrimination in fixed samples . *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 9, Unit 9.34.
- Peters, E. (1. Februar 2018). Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, Vol. 24, No. 1, S. 1-24.
- Pirillo, A., Norata, G., & Catapano, A. (2013). LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2013.
- Pitzurra, L., & Loos, B. (Juni 2020). [Stress and periodontitis] . *Nederlands Tijdschrift voor Tandheelkunde*, Vol. 127, No. 6, S. 358-364.
- Poznyak, A. V., Nikiforov, N. G., Markin, A. M., Kashirskikh, D. A., Myasoedova, V. A., Gerasimova, E. V., et al. (11. Januar 2021). Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 11.
- Rauschert, S., Gázquez, A., Uhl, O., Kirchberg, F., Demmelmair, H., Ruíz-Palacios, M., et al. (22. Januar 2019). Phospholipids in lipoproteins: compositional differences across VLDL, LDL, and HDL in pregnant women. *Lipids in Health and Disease*, Vol. 18, No.1, S. 20.
- Reinbold, M. (2007). Induktion von Apoptose durch ungesättigte Fettsäuren in Zellen des kardiovaskulären Systems. 38-39. Marburg/Lahn: Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg.
- Reinhold, S., Blankesteyn, W. M., & Foulquier, S. (Dezember 2020). The Interplay of WNT and PPAR γ Signaling in Vascular Calcification, Vol. 9, No. 12. *cells*, S. 2658.
- Rekhi, U., Catunda, R. Q., Alexiou, M., Sharma, M., Fong, A., & Febbraio, M. (Juni 2021). Impact of a CD36 inhibitor on Porphyromonas gingivalis mediated atherosclerosis. *Archives of Oral Biology*, Vol. 126.

- Relling, I., Akcay, G., Fangmann, D., Knappe, C., Schulte, D., Hartmann, K., et al. (November 2018). Role of wnt5a in Metabolic Inflammation in Humans, . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 103, No.11, S. 4253-4264.
- Rodríguez-Lozano, B., González-FeblesJ., Garnier-Rodríguez, J., Dadlani, S., Bustabad-Reyes, S., Sanz, M., et al. (Januar 2019). Association between severity of periodontitis and clinical activity in rheumatoid arthritis patients: a case-control study . *Arthritis Research & Therapy*, Vol. 21, No. 1, S. 27.
- Rosset, E., & Bradshaw, A. (Mai-Juli 2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*, Vol. 52-54, S. 78-87.
- Roth, A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S., Abyu, G., et al. (4. Juli 2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 . *Journals of the American College of Cardiology*, Vol. 70, No. 1, S. 1-25.
- Russo, S., Kwiatkowski, M., Govorukhina, N., Bischoff, R., & Melgert, B. N. (5. November 2021). Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites . *Frontiers in Immunology*, Vol. 12.
- Ryu, H., Kim, J., Kim, D., Lee, J.-E., & Chung, Y. (November 2019). Cellular and Molecular Links between Autoimmunity and Lipid Metabolism. *Molecules and Cells*, Vol. 42, No. 11, S. 747-754.
- Santiago-Fernández, C., Martin-Reyes, F., Tome, M., Ocaña-Wilhelmi, L., Rivas-Becerra, J., Tatzber, F., et al. (April 2020). Oxidized LDL Modify the Human Adipocyte Phenotype to an Insulin Resistant, Proinflammatory and Proapoptotic Profile. *Biomolecules*, Vol. 10, No. 4, S. 534.
- Sanz, M., Castillo, A., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J., D'Aiuto, F., Bouchard, P., et al. (März 2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 47, No. 3, S. 268-288.
- Schaftenaar, F., Frodermann, V., Kuiper, J., & Lutgens, E. (Juni 2016). Atherosclerosis the interplay between lipids and immune cells. *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 27, No. 3, S. 209-215.
- Schenkenbein, H., & Loos, B. (April 2013). Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 40 No. 14, S. 51-69.
- Schulte, D., Müller, N., Neumann, K., Oberhäuser, F., Faust, M., Güdelhöfer, H., et al. (23. Februar 2012). *Pro-Inflammatory wnt5a and Anti-Inflammatory sFRP5 Are Differentially Regulated by Nutritional Factors in Obese Human Subjects*. Abgerufen am 21. Januar 2021 von Public Library of Science (PLOS) one : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3285685/>
- Shao, Y., Zheng, Q., Wang, W., Xin, N., Song, X., & Zhao, C. (Oktober 2016). Biological functions of macrophage-derived Wnt5a, and its roles in human diseases. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 41, S. 67674-67684.

- Shatrov, V., Sumbayev, V., Zhou, J., & Brüne, B. (15. Juni 2003). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms . *Blood*, Vol. 101, No. 12, S. 4847-4849.
- Shioda, M., Muneta, T., Tsuji, K., Mizuno, M., Komori, K., Koga, H., et al. (18. Mai 2017). TNF α promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. *Public Library of Science (PLOS) One*, Vol. 12, No. 5, S. e0177771.
- Sikura, K., Combi, Z., Potor, L., Szerafin, T., Hendrik, Z., Méhes, G., et al. (Januar 2021). Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization. *Journal of Advanced Research*, Vol. 27, S. 165-176.
- Smalley, J. (Juli 1994). Pathogenic mechanisms in periodontal disease . *Advances in Dental Research*, Vol. 8, No. 2, S. 320-328.
- Song, R., Zeng, Q., Ao, L., Yu, J., Cleveland, J., Zhao, K., et al. (November 2013). Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor 2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol. 32, No. 11, S. 2711-2720.
- Stanko, P., & Izakovicova Holla, L. (2014). Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review . *Biomedical Papers of the Faculty of Medicine of Palacký University, Olomouc, Czech Republic*, Vol. 158, No. 1, S. 35-38.
- Stevens, A., Wheeler, C., Tannenbaum, S., & Grodzinsky, A. (April 2008). Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF-alpha but not IL-1beta treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 16, No. 4, S. 489-497.
- Takei, A., Huang, Y., & Lopes-Virella, M. (Januar 2001). Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL . *Atherosclerosis*, Vol. 154, No. 1, S. 79-86.
- Taketa, K., Matsumura, T., Yano, M., Ishii, N., Senokuchi, T., Motoshima, H., et al. (11. April 2008). Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, No. 15, S. 9852-9862.
- Thiemann, F., Cullen, P. M., & Klein, H.-G. (2015). *Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Trpkovic, A., Resanovic, I., Stanimirovic, J., Radak, D., Mousa, S., Cenic-Milosevic, D., et al. (2015). Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases . *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Vol. 52, No. 2, S. 70-85.
- Unno, Y., Sakai, M., Sakamoto, Y.-I., Kuniyasu, A., Nagai, R., Nakayama, H., et al. (Juni 2005). Glycolaldehyde-modified bovine serum albumin downregulates leptin expression in mouse adipocytes via a CD36-mediated pathway . *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1043, S. 696-701.

- Venkatesh, D., Kumar, K., & Alur, J. (Mai-August 2017). Gingival mesenchymal stem cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, Vol. 21, No. 2, S. 296-298.
- Vimalraj, S. (5. September 2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, Vol. 754, S. 144855.
- Voskamp, C., Koevoet, W., Somoza, R., Caplan, A., Lefebvre, V., van Osch, G., et al. (30. Juni 2020). Enhanced Chondrogenic Capacity of Mesenchymal Stem Cells After TNF α Pre-treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, S. 658.
- Walton, R., Zhu, B., Unal, R., Spencer, M., Sunkara, M., Morris, A., et al. (1. Mai 2015). Increasing adipocyte lipoprotein lipase improves glucose metabolism in high fat diet-induced obesity. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, No. 18, S. 11547-11556.
- Wang, C.-W. (., & McCauley, L. (Dezember 2016). Osteoporosis and Periodontitis. *Current Osteoporosis Reports*, Vol. 14, No. 6, S. 284-291.
- Weiss, A., & Dahlke, M. (2019). Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Frontiers in Immunology*, Vol. 10, S. 1191.
- Wen, S., Beltrán, V., Chaparro, A., Espinoza, F., & Riedemann, J. (Juni 2019). [Association between chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. A systematic review]. *Revista medica de Chile*, Vol. 147, No. 6, S. 762-775.
- World Health Organization. (01. April 2020). Abgerufen am 18. Januar 2021 von Obesity and overweight: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Wu, B., Fillenbaum, G., Plassman, B., & Guo, L. (April 2016). Association Between Oral Health and Cognitive Status: A Systematic Review. *Journal of the American Geriatrics Society*, Vol. 64, No. 4, S. 739-751.
- Wu, H., & Ballantyne, C. (21. Mai 2020). Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research*, Vol. 126, No. 11, S. 1549-1564.
- Wu, M.-Y., Li, C.-J., Hou, M.-F., & Chu, P.-Y. (Oktober 2017). New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18, No. 10, S. 2034.
- Xie, W., Li, L., Gong, D., Zhang, M., Lv, Y., Guo, D., et al. (Oktober 2019). Krüppel-like factor 14 inhibits atherosclerosis via mir-27a-mediated down-regulation of lipoprotein lipase expression in vivo. *Atherosclerosis*, Vol. 289, S. 143-161.
- Yamashita, M., Nomura, Y., Ishikawa, M., Shimoda, S., & Hanada, N. (November 2020). Oxidized Low-Density Lipoprotein Promotes In Vitro Calcification. *Materials (Basel)*, Vol. 13, No. 22, S. 5120.
- Yang, H., Mohamed, A., & Zhou, S.-H. (2. Juli 2012). Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*, Vol. 11, S. 85.

- Yang, T., Guo, L., Chen, L., Li, J., Li, Q., Pi, Y., et al. (November 2020). A novel role of FKN/CX3CR1 in promoting osteogenic transformation of VSMCs and atherosclerotic calcification. *Cell Calcium*, Vol. 91, S. 102265.
- Yokota, K. (2017). [Inflammation and osteoclasts]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, Vol. 40, No. 5, S. 367-376.
- Yung, L., Sánchez-Duffhues, G., Ten Dijke, P., & Yu, P. (1. November 2015). Bone morphogenetic protein 6 and oxidized low-density lipoprotein synergistically recruit osteogenic differentiation in endothelial cells. *Cardiovascular Research*, Vol. 108, No. 2, S. 278-287.
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (15. Juni 2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 877, S. 173090.
- Zettler, M., Prociuk, M., Austria, J., Massaeli, H., Zhong, G., & Pierce, G. (Februar 2003). OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 284, No. 2, S. 644-653.
- Zhang, B., Tian, X., Hao, J., Xu, G., & Zhang, W. (Januar-Dezember 2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Tissue Regeneration. *cell transplantation*, Vol. 29.
- Zhang, P.-Y., Xu, X., & Li, X.-C. (Oktober 2014). Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, Vol. 18, No. 20, S. 3091-3096.
- Zhang, Y., Song, Y., Guo, X., Miao, R., Fu, Y., Miao, C., et al. (2019). Exosomes derived from oxLDL-stimulated macrophages induce neutrophil extracellular traps to drive atherosclerosis. *Cell Cycle*, Vol. 18, No. 20, S. 2672-2682.
- Zhao, C., Bu, X., Wang, W., Ma, T., & Ma, H. (2014). GEC-derived SFRP5 Inhibits Wnt5a-Induced Macrophage Chemotaxis and Activation. *Public Library of Science (PLOS) one*, Vol.9, No. 1, S. e85058.
- Zhao, M., Dai, W., Wang, H., Xue, C., Feng, J., He, .., et al. (September 2019). Periodontal ligament fibroblasts regulate osteoblasts by exosome secretion induced by inflammatory stimuli. *Archives of Oral Biology*, Vol. 105, S. 27-34.
- Zhou, L.-L., Liu, W., Wu, Y.-M., Sun, W.-L., Dörfer, C., & Fawzy El-Sayed, K. (2020). Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters. *Stem Cells International*, Vol. 2020, S. 1327405.
- Zhou, Y., Kipps, T., & Zhang, S. (12. April 2017). *Wnt5a Signaling in Normal and Cancer Stem Cells*. Abgerufen am 19. Januar 2021 von Stem Cells International: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5405594/>
- Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., et al. (September 2018). Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*, Vol. 8, No. 3, S. 80.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Metabolische Inflammation	2
Abbildung 2 Rolle von oxLDL in der endothelialen Dysfunktion.....	4
Abbildung 3 Rolle von oxLDL in der Bildung von Schaumzellen	5
Abbildung 4 Rolle von oxLDL in der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen	6
Abbildung 5 Rolle von oxLDL in der proatherosklerotischen Funktion von Thrombozyten	7
Abbildung 6 Strukturelemente des Zahnhalteapparates	11
Abbildung 7 Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen	22
Abbildung 8 Gingiva-Probe und wachsendes Mischgewebe.....	34
Abbildung 9 Positiv-Selektion mit MACS® Technologie	36
Abbildung 10 RNA-Extraktion mittels RNeasy® Mini Kit.....	48
Abbildung 11 Reverse Transkription mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit	50
Abbildung 12 Prinzipien der Polymerase Chain Reaction (PCR)	52
Abbildung 13 Durchflusszytometrie: Expressionsprofil charakteristischer Oberflächenmarker der G-MSCs.....	57
Abbildung 14 Osteogene Differenzierung am Tag 10.....	58
Abbildung 15 Optische Dichtemessung der osteogenen Differenzierung	59
Abbildung 16 Osteogene Differenzierung.....	60
Abbildung 17 Genexpression: osteogene Differenzierung.....	61
Abbildung 18 Optische Dichtemessung der adipogenen Differenzierung	62
Abbildung 19 Adipogene Differenzierung	63
Abbildung 20 Genexpression: adipogene Differenzierung.....	64
Abbildung 21 Chondrogene Differenzierung	65
Abbildung 22 Digital image quantification der chondrogenen Differenzierung	66
Abbildung 23 Genexpression: chondrogene Differenzierung	67
Abbildung 24 Teststatistik Colony Forming Unit nach 7 Tagen	68
Abbildung 25 Colony Forming Unit (CFU)	69
Abbildung 26 Proliferationskurven	70
Abbildung 27 Mikroskopische Aufnahme nach 5 minütiger Behandlung mit Accutase.....	71
Abbildung 28 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSC) vor Stimulation	71
Abbildung 29 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSC) nach sieben Tagen Stimulation	72
Abbildung 30 Genexpressionsprofil: Stammzellgene	73

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte	28
Tabelle 2 Verbrauchsmaterial.....	29
Tabelle 3 Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien.....	30
Tabelle 4 CD-Antigene und -Antikörper	31
Tabelle 5 Fertige Reaktionssysteme	32
Tabelle 6 Primer.....	32
Tabelle 7 Gruppenaufbau: Vergleich der Nährmedien	38
Tabelle 8 Programmierung der PCR-Zyklen am LightCycler®.....	53
Tabelle 9 Primer Namen und ID für real-time PCR der Differenzierung.....	54
Tabelle 10 Primer Namen und ID für real-time PCR der Stammzellgene	54

9. Hervorgegangene Publikationen und Präsentationen dieser Arbeit

9.1 Publikation

Fawzy El-Sayed, K.; Mahlandt, E.; Schlicht, K.; Enthammer, K.; Tölle, J.; Wagner, J.; Hartmann, K.; Ebeling, P.R.; Graetz, C.; Laudes, M.; Dörfer, C.E.; Schulte, D.M. (2. Juli 2024). Effects of oxidized LDL versus IL-1 β /TNF- α /INF γ on human gingival mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontal Research*, Vol. 60, No. 1, S. 77-89.

9.2 Präsentation

E. Mahlandt, J. Tölle, J. Schulz, K. Hartmann, M. Laudes, C. Graetz, C. Dörfer, D. M. Schulte, K.M. Fawzy El-Sayed, The effect of oxidized LDL compared to IL-1 β /TNF- α /INF γ cocktail on stemness and differentiation properties of human gingival mesenchymal stem cells, EuroPerio 10, 15-18 Juni 2022, Kopenhagen

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während des Studiums und insbesondere bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dominik M. Schulte für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgemeinschaft promovieren zu dürfen. Danke möchte ich sagen für die stets freundliche Hilfe bei thematischen Fragen meinerseits, für die produktiven Anregungen zu weiterführenden Fragestellungen sowie die konstruktiven Gespräche, die mich ermutigt haben, mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Karim Mohammed Fawzy El-Sayed für seine vielfältige Unterstützung und Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Mojgan Paymard-Stolz und Regina Marquardt für die ausgezeichnete Betreuung im Zellkultur-Labor bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Vielen Dank für den regelmäßigen Austausch auf fachlicher und persönlicher Ebene. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Johannes Tölle bedanken, der stets Verständnis für meine Fragestellungen zeigte und mir immer mit der richtigen Hilfestellung beistand. Durch die freundliche Aufnahme, das Engagement und die Zusammenarbeit in der Arbeitsgemeinschaft fühlte ich mich von Beginn an willkommen und gut begleitet auf meinem Weg. Insgesamt war die wissenschaftliche Arbeit in der Forschungsgruppe zu jeder Zeit geprägt von einer angenehmen Atmosphäre, wertvollen Diskussionen und gegenseitiger Unterstützung unter den Doktoranden und Mitarbeitern des Forschungslabors.

Des Weiteren möchte ich Katharina Hartmann meinen Dank äußern, die durch Ihre Bemühungen, Organisation und fachliche Kompetenz auf meine Arbeit positiv Einfluss nahm. Einen wichtigen Beitrag leistete dabei auch das gesamte Team der Ernährungsmedizin unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Laudes.

Bei meinen Freunden und Studienkollegen möchte ich mich bedanken, die mich unterstützt und immer wieder aufgeheitert haben. Meiner Schwester danke ich von ganzem Herzen für ihre Mitwirkung und ihren einfühlsamen Rückhalt auch in schwierigen Zeiten. Danke, dass ich immer auf dich zählen kann. Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir erst die Möglichkeit boten, dieses Studium zu absolvieren. Danke, dass ihr mir jederzeit auf vielseitige Weise, liebevoll zur Seite steht und mich bei der Verwirklichung meiner Ziele vertrauensvoll unterstützt.