

Aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie an der Universitätsmedizin Rostock

– Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. J. Rychly –

Einfluss von Medikation und Erkrankungen auf funktionelle Eigenschaften
mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Susanne Cuber geb. Knöfler

2017

Dekan: Prof. Dr. med. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Rychly
Arbeitsbereich Zellbiologie
Universitätsmedizin Rostock
 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Universitätsmedizin Rostock
 3. Gutachter: PD Dr. med. habil. Andreas Hoehne
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Universitätsmedizin Greifswald
- Datum der Einreichung: 22.03.2017
Datum der Verteidigung: 28.11.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Mesenchymale Stammzellen	3
1.1.1	Definitionskriterien	3
1.1.2	Vorkommen und Differenzierung	4
1.1.3	Klinische Anwendungsgebiete mesenchymaler Stammzellen.....	5
1.2	Charakterisierung, Wirkungsweise und Effekte der untersuchten Medikamente	6
1.2.1	Simvastatin.....	6
1.2.2	Acetylsalicylsäure (ASS)	7
1.2.3	Ramipril.....	8
1.2.4	Bisoprolol.....	9
1.3	Definition und Einteilung der untersuchten Erkrankungen.....	11
1.3.1	Arterielle Hypertonie.....	11
1.3.2	Koronare Dreifäßerkrankung.....	12
1.3.3	Hyperlipidämie.....	12
1.3.4	Diabetes mellitus Typ II.....	13
1.3.5	Aortenklappenstenose	14
2	Frage- und Zielstellung	16
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Zellgewinnung	17
3.2	Zellpassage	17
3.3	Zellzahlbestimmung	17
3.4	Charakterisierung von Proliferation der Zellen in vitro	18
3.5	Test auf Aktivität der alkalischen Phosphatase mittels Fast red Färbung	18
3.6	Erhebung der Patientendaten	20
3.7	Probleme bei der Datenerhebung	20
3.8	Statistische Methoden.....	20

3.8.1	Datenerhebung mit Excel	20
3.8.2	Datenverarbeitung mit SPSS	20
4	Ergebnisse	23
4.1	Allgemeine Angaben zum Patientenkollektiv	23
4.1.1	Altersverteilung des gesamten Patientenkollektivs	23
4.1.2	Altersverteilung der Frauen	24
4.1.3	Altersverteilung der Männer	25
4.1.4	Vorerkrankungen	25
4.1.5	Medikamenteneinnahme	29
4.1.6	OP-Indikation	32
4.2	Zusammenhang zwischen der Proliferation der Zellen in vitro und den Krankheiten sowie Medikation	35
4.2.1	Proliferation der Zellen im Gesamtkollektiv	35
4.2.2	Proliferation der Zellen im Frauenkollektiv	37
4.2.3	Proliferation der Zellen im Männerkollektiv	39
4.3	Zusammenhang zwischen der spontanen Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Zellen in vitro und der Krankheiten sowie Medikation	41
4.3.1	Spontane ALP- Aktivität der Zellen im Gesamtkollektiv	41
4.3.2	Spontane ALP-Aktivität der Zellen im Frauenkollektiv	43
4.3.3	Spontane ALP-Aktivität der Zellen im Männerkollektiv	45
5	Diskussion	47
6	Zusammenfassung	52
7	Thesen	53
8	Abkürzungsverzeichnis	54
9	Tabellenverzeichnis	55
10	Abbildungsverzeichnis	56
11	Literatur	57

1 Einleitung

1.1 Mesenchymale Stammzellen

Die erstmalige Beschreibung von mesenchymalen Stammzellen erfolgte 1968 durch Friedenstein et al. als *osteogenic stem cells* (Friedenstein et al. 1968). Die Bezeichnung mesenchymale Stammzelle (MSC) wird allgemein für aus dem Knochenmark gewonnene Zellen angewandt, die die Fähigkeit besitzen an Plastik zu adhären und ein multipotentes Differenzierungspotential *in vitro* zeigen. Sie zählen zu den adulten Stammzellen (Horwitz et al. 2005). In der Zellbiologie unterscheidet man zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen. Totipotente Stammzellen sind in der Lage aus sich heraus einen kompletten Organismus zu bilden. Pluripotente Zellen hingegen können sich zu jeglicher Zelle eines Organismus entwickeln, jedoch nicht einen Organismus bilden. Aus der pluripotenten Stammzelle entwickeln sich, wie in unserem Fall der mesenchymalen Stammzelle, multipotente Stammzellen. Diese sind dazu in der Lage zu allen Zellen eines bestimmten Gewebes zu differenzieren. Dazu gehören unter anderem die hämatopoietischen Stammzellen, aus welchen Zellen des Blutsystems entstehen und mesenchymale Stammzellen, welche Zellen des Bindegewebes bilden. Viele adulte Gewebe enthalten für Regenerationsprozesse bei Trauma, Krankheit oder Alter Stammzellpopulationen (Pittenger et al. 1999). Unter dem Einfluss verschiedener spezifischer Stimulatoren kommt es zur Differenzierung in spezialisierte Zellen einzelner Zelllinien (Bianco und Robey 2001).

1.1.1 Definitionskriterien

Die MSC besitzen keine spezifischen Oberflächenmarker und kommen häufig nur in geringer Anzahl vor. Es hat sich gezeigt, dass bei der Kultivierung von Stammzellen *in vitro* viele verschiedene Methoden zur Isolation und Ansätze zur Charakterisierung der Zellen gibt. Zur besseren Vergleichbarkeit hinsichtlich biologischer Eigenschaften und experimenteller Forschungsergebnisse ist somit eine genaue Charakterisierung notwendig. Bei der erstmaligen Beschreibung mit dem Terminus MSC von Caplan 1991 wurde folgendes beschrieben: Eine mesenchymale Stammzelle ist eine multipotente Vorläuferzelle, dessen Nachkommen nach mehrmaliger Teilung Knorpel, Knochen, Sehnen, Bänder, Knochenmarkstroma und Bindegewebe bilden (Caplan 1991). MSC besitzen die Oberflächenproteine CD29, CD44, CD73, CD105, CD106, CD166, *stro-1*, und HLA-ABC. Die Oberflächenmarker CD34, CD14, und CD45 hingegen werden bei keiner MSC nachgewiesen. Eine weitere Charakterisierung gelingt anhand ihrer spindelförmigen Morphologie sowie ihrem Adhäsionsvermögen an Plastikoberflächen.

Die International Society for Cellular Therapy hat diese minimalen Kriterien in ihrem Position Paper von 2006 zur besseren Identifizierung und Vergleichbarkeit hinsichtlich der Charakterisierung von Stammzellen zusammengefasst:

- unter standardisierten Kulturbedingungen sollen MSC an Kunststoff adhären,
- die CD-Markergene (engl. cluster of differentiation) CD105 (Endoglin), CD73 (Ecto-5'-nucleotidase) und CD90 (Thy1) müssen bei mindestens 95% der Zellen nachweisbar sein,
- die Oberflächenmarker CD45 (spezifisch für Leukozyten), CD34 (spezifisch für hämatopoietische Vorläufer und Endothelzellen), CD14 (spezifisch für Makrophagen), CD11b (spezifisch für Monozyten), CD79A (spezifisch für B-Zellen), CD19 (spezifisch für B-Zellen) und humane Leukozyten-Antigen DR (HLADR) sollten hingegen nicht nachweisbar sein und
- die mesenchymalen Stammzellen sollten ein Differenzierungspotential zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten in vitro aufweisen (Dominici et al. 2006).

1.1.2 Vorkommen und Differenzierung

Die meisten mesenchymalen Stammzellen findet man zusammen mit hämatopoietischen Stammzellen, einer weiteren Form adulter Stammzellen, im Knochenmark. Dort bilden MSC einen wichtigen Bestandteil der hämatopoietischen Stammzellennische (da Silva Meirelles et al. 2008). Das Konzept einer sogenannten Stammzellennische wurde erstmals 1978 als spezielle Mikroumgebung für hämatopoietische Stammzellen beschrieben, in der die Selbsterneuerung dieser Zellen gewährleistet wird (Schofield 1978).

Diese sogenannten Nischen sind spezifische anatomische Kompartimente, in denen man Stammzellpopulationen in vivo vorfindet und welche ihre Existenz sichern. Eine Vielzahl an Signalen steuern die Proliferation sowie die Entwicklung von Tochterzellen der Stammzellen (Jones und Wagers 2008). Zu diesen Signalen zählen u.a. Oberflächenmoleküle sowie lösliche, intrinsische Faktoren, Zell-Zell Kontakte und Signale der extrazellulären Matrix, welche sowohl chemischer als auch mechanischer Natur sein können. Auf diese Weise schützen sie Stammzellen sowohl vor Abbau als auch vor Überproduktion und Entartung (Scadden 2006; Jones und Wagers 2008). Es wird angenommen, dass MSC in nahezu allen adulten Gewebe in einer perivaskulären Nische und assoziiert mit Blutgefäßen vorliegen (da Silva Meirelles et al. 2006). Im Falle von Entzündungsreaktionen, Trauma oder Erkrankung können die MSC dadurch entlang von Blutgefäßen schnellstmöglich in entfernte Gewebe gelangen (Kuhn und Tuan 2010).

Mesenchymale Zellen sind dazu in der Lage in verschiedene Zelllinien zu differenzieren (Deng et al. 2009). Mithilfe von spezifischen Stimulatoren wie z.B. spezielle Wachstumsfaktoren, erfolgt die Differenzierung zu spezialisierten Zellen. Je nach Art der Stimulation erfolgt die Differenzierung zu Chondrozyten, Osteoblasten oder Adipozyten (Chen und Tuan 2008; Bianco und Robey 2001; Pittenger et al. 1999). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass das Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stammzellen nicht nur auf Zellen des Bindegewebes beschränkt ist. In vitro zeigte sich eine Differenzierung zu Zellen mit Charakteristika von Endothelzellen (Oswald et al. 2004), Neuronen (Kohyama et al. 2001) und Kardiozyten (Makino et al. 1999). In vitro ist die Wahl eines geeigneten Kulturmedium entscheidend für das Wachstum, die Differenzierung, das Potential und die Oberflächenmarker der mesenchymalen Stammzellen (Hagmann et al. 2013).

1.1.3 Klinische Anwendungsgebiete mesenchymaler Stammzellen

Die komplette Geweberegeneration durch MSC ist ein komplexer Vorgang, bei dem vor allem die Integration im Gewebe und die natürliche Differenzierung durch Signale des Körpers große Herausforderungen darstellen (Bobis et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass gerade mesenchymale Stammzellen die Möglichkeit haben, sich in verschiedenste Gewebe und Organe einzufügen und über einen langen Zeitraum erhalten und stabil zu bleiben (Devine und Hoffman 2000; Drize et al. 1992). Auch bei peripherer Applikation wandern mesenchymale Stammzellen zum Ort der Verletzung im Organismus. Dieses Phänomen konnte bei Knochenbrüchen, zerebraler Ischämie und auch bei Herzinfarkten gezeigt werden (Shake et al. 2002; Wang et al. 2002). Aufgrund dieser vielseitigen Anpassungsfähigkeit und immunmodulatorischen und -suppressiven Eigenschaften ergeben sich zahlreiche Anwendungsgebiete mesenchymaler Stammzellen in der Medizin:

- Die Differenzierungsmöglichkeit zu Chondrozyten und die Fähigkeit zur Immunmodulation und Anti-Inflammation machen sie zu einem idealen Zelltyp zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis. Somit können zerstörte Gelenke regeneriert und zusätzlich Entzündungsreaktionen vermindert werden (Chen und Tuan 2008).
- In Tiermodellen zeigt die Anwendung von MSC durch Verstärkung der Immunantwort und Förderung endogener Reparaturmechanismen Möglichkeiten in der Behandlung Multipler Sklerose (Bai et al. 2009).
- Weiterhin wurde beobachtet, dass zusätzlich applizierte MSC den Heilungsprozess nach Knochenmarkstransplantation beschleunigten, die Graft-versus-Host Abstoßungsreaktion

verringerten und das Einwachsen von transplantierten Organen verbesserten (Le Blanc et al. 2004).

- Ein sich entwickelnder Ansatz ist die Behandlung von Myokardinfarkten und der daraus resultierenden Funktionseinschränkung aufgrund von entstandenem Narbengewebe. Es konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten aus mesenchymalen Stammzellen regeneriert werden können (Makino et al. 1999). In einer präklinischen Studie bewirkte die Zugabe von MSC in das Infarktareal bei Mäusen eine signifikante Reduktion des zerstörten Gewebes und eine signifikante Erhöhung des linksventrikulären Volumens (Noiseux et al. 2006). Diese und andere Studien zeigen, dass der Einsatz von MSC in der Therapie von Herzinfarkten in der Zukunft eine entscheidende Rolle spielen könnte (Williams et al. 2013; Quevedo et al. 2009).

1.2 Charakterisierung, Wirkungsweise und Effekte der untersuchten Medikamente

1.2.1 Simvastatin

Das Medikament Simvastatin kann das kardiovaskuläre Risiko von Patienten mit Hypercholesterinämie senken (Pedersen et al. 2004). Es ist ein semisynthetisches Derivat von Lovastatin, welches aus *Aspergillus terreus* gewonnen wird (Alberts 1990; Alberts et al. 1980). Das Enzym HMG-CoA Reduktase katalysiert die Umwandlung von HMG - CoA zu Mevalonat in der Leber. Dieser erste Schritt der Cholesterinbiosynthese wird durch Simvastatin gehemmt. Somit wird frühzeitig Hypercholesterinämie verhindert, welche ein primärer Risikofaktor für Atherosklerose darstellt (Kannel et al. 1961). Zusätzlich kommt es zur vermehrten Expression von LDL - Rezeptoren in der Leber, dadurch sinkt die Konzentration von „low – density“ Cholesterin im Gefäßsystem (LDL, schlechtes Cholesterin) und es steigt die Konzentration von „high – density“ Cholesterin (HDL, gutes Cholesterin), wodurch Plaquebildung im Gefäßsystem vorgebeugt wird (Barrios-González und Miranda 2010). Statine haben auch Wirkungen, die unabhängig vom cholesterinsenkenden Effekt sind. Diese verschiedenen Effekte werden in der Pharmakologie als pleiotrop bezeichnet. Dazu gehören unter anderem:

- die Verminderung von inflammatorischen Prozessen (Pruefer et al. 1999)
- die Stimulation zur Bildung neuer Gefäße (Kureishi et al. 2000)
- die Modulation von Leukozytenaktivierung und Leukozytenadhäsion auf zellulärer Ebene (Weber et al. 1997)
- Verminderung des Ischämie - Reperfusionsschadens nach myokardialer Ischämie (Di Napoli et al. 2001) und

- einen auf Knochen stimulierenden Effekt (Zhao und Liu 2014).

1.2.2 Acetylsalicylsäure (ASS)

Die Acetylsalicylsäure (ASS) ist ein Medikament, welches bereits in der Antike, gewonnen aus Weidenbaumrinde, zur Behandlung von Schmerzen und Fieber genutzt wurde. ASS wird zu der Wirkstoffgruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) gezählt, wozu unter anderem auch Metamizol, Ibuprofen und Diclofenac gehören. Seine Wirkung erzielt ASS über die Hemmung der Prostaglandin G/H Synthase (= Cyclooxygenase, COX) während der Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure. Gebildet werden bei dieser Reaktion Prostaglandine wie z.B. Thromboxan A₂ und Prostacyclin. Die Cyclooxygenase existiert in 2 Isoformen (Awtry und Loscalzo 2000; Vane et al. 1998). Nach Entdeckung der zweiten Isoform, gab es zunächst eine konkrete Zuweisung von Funktionen und Wirkungsorten der beiden COX-Isoformen. Die erste Isoform (COX-1) sei in den meisten Zellen im endoplasmatischen Retikulum vorhanden (Morita et al. 1995) und katalysiert die Synthese von Prostaglandinen, die für die normale Zellfunktion, zum Schutz der Magenmukosa, Aufrechterhaltung des renalen Blutflusses und zur Regulation von Thrombozytenaktivierung und -aggregation zuständig sind (Smith 1992). Die zweite Isoform (COX-2) sei im Normalfall nicht in allen Körperzellen vorhanden, dafür aber durch Entzündungsstimuli und Wachstumsfaktoren in inflammatorischen Gewebe schnell induzierbar und resultiert in der Produktion von Prostaglandinen, die für Entzündungsreaktionen benötigt werden (Xie et al. 1991). Das Prinzip der Arbeitsteilung der zwei COX-Isoformen konnte jedoch widerlegt und auch Überschneidungen in der Funktion demonstriert werden (Lipsky 1999).

Acetylsalicylsäure ist ein nicht selektiver Inhibitor beider Isoformen der Cyclooxygenase. Schon in geringer Konzentration hemmt es somit die Bildung von TXA₂, wodurch es zur irreversiblen Hemmung der Thrombozytenaggregation kommt (Roth und Majerus 1975). Kernlose Thrombozyten sind aufgrund ihres limitierten Proteinsyntheseapparats nur begrenzt dazu in der Lage die Cyclooxygenase neu zu synthetisieren. Erst 7-10 Tagen nach Absetzen des Medikaments ist eine erneute Produktion der COX und somit die Bildung von Thromboxan A₂ durch eine neue Thrombozytenpopulation möglich. Die Hemmung des stärksten endogenen Gegenspielers von TXA₂, der Prostacyclinsynthese, ist dahingehend in seiner antithrombotischen Funktion nicht so stark beeinflusst. Sie kann in kernhaltigen Endothelzellen synthetisiert werden und steht somit dem Organismus wieder zur Verfügung. Der Haupteffekt des Medikaments ist somit in niedriger Dosierung (75-100mg) die Thrombozytenaggregationshemmung (Reilly und FitzGerald 1988).

ASS ist aufgrund dieser Funktion an einer signifikanten Senkung der Mortalität und der Reinfarktrate beteiligt und ein effektives und weit verbreitet genutztes Medikament in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie der Arteriosklerose, des akuten koronaren Herzsyndroms und der ischämischen Kardiomyopathie (Sanmuganathan et al. 2001; Awtry und Loscalzo 2000; Hung 2003). Es wird zur Behandlung von Schmerzen und zur Vorbeugung oder Nachsorge bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt (Awtry und Loscalzo 2000).

1.2.3 Ramipril

Die ersten Wirkstoffe, die eine hemmende Wirkung auf das Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE) zeigten, wurden aus dem Gift der brasilianischen Jararaca-Lanzenotter isoliert. Eine orale Wirksamkeit der ACE-Inhibitoren entstand durch eine Abwandlung der kurzwirksamen Peptide im Schlangengift (Smith und Vane 2003). Die Medikamentenklasse der ACE-Hemmer spielt heutzutage eine tragende Rolle in der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Ein Vertreter ist das hier aufgeführte Ramipril. Ramipril selbst ist ein sogenanntes inaktives Prodrug und gehört zu der zweiten Generation von ACE-Inhibitoren, welches erst nach Metabolisierung in der Leber und zu einem geringeren Anteil in der Niere zu seinem aktiven Metabolit Ramiprilat umgewandelt wird. Aus diesem Grund besitzt es eine lange Halbwertszeit und muss nur einmal täglich appliziert werden (Frampton und Peters 1995). Diese Metabolisierung erfolgt mithilfe der Carboxylesterase I (Thomsen et al. 2013). Seine Wirkung entfaltet das Medikament über die Hemmung des ACE und somit die Metabolisierung von Angiotensin I (AT I) zu Angiotensin II (AT II). AT II ist der biologisch aktive Metabolit im sogenannten Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und entfaltet seine Wirkungen über zwei Rezeptoren: den Angiotensin I Rezeptor (ATI-Rezeptor) und den Angiotensin II Rezeptor (ATII-Rezeptor). Die Hauptwirkung erfolgt über den ATI-Rezeptor. Dabei kommt es im Organismus zu Vasokonstriktion, Freisetzung von Aldosteron und Vasopressin sowie zur Retention von Natrium und Wasser. Diese Komponenten sind somit an der Regulierung des Blutdrucks, der Balance im Wasser- und Elektrolythaushalt und der Regulierung der renalen Funktion beteiligt. Zusätzlich gibt es eine Beteiligung des ATI-Rezeptors an Zellwachstum und -proliferation und somit Entwicklung von u.a. Linksherzhypertrophie, Nephrosklerose, vaskuläre Mediahypertrophie und endothelialer Dysfunktion (Kaschina und Unger 2003). Über die Hemmung des ACE durch ACE-Inhibitoren, wie z.B. Ramipril kommt es zu einer verminderten Bildung von Angiotensin II. In der Behandlung von arterieller Hypertonie bewirkt es aufgrund einer verminderten Ausschüttung von Aldosteron eine verringerte Retention von Natrium und Wasser. Weiterhin nimmt der Gefäßtonus ab und es kommt zu einer

Blutdrucksenkung. Zusätzlich vermindert es die Vorlast am Herzen und kommt somit zur Behandlung von Herzinsuffizienz zum Einsatz.

1.2.4 Bisoprolol

Bisoprolol gehört zu der zweiten Generation an β -Blockern und ist äußerst selektiv für den β_1 -Rezeptor am Herzen (Metra et al. 2004). Bei steigenden Dosierungen (>20mg) kann es auch zu einer Bindung an den β_2 -Rezeptoren kommen, allerdings liegt die Selektivität zu β_1 -Rezeptoren ungefähr 120fach größer (Reiter 2004). An den Myozyten am Herzen sind drei verschiedene Arten an adrenergen Rezeptoren vorzufinden: β_1 -, β_2 - und α_1 -Rezeptoren (Bristow 2000). β_1 -Rezeptoren befinden sich hauptsächlich am Herzen sowie in den Nieren und im Fettgewebe. Durch die Aktivierung der β_2 -Rezeptoren kommt es zur Entspannung der glatten Muskulatur peripherer Gefäße, der Bronchien der Lunge und des Uterus. Auch am Herzen finden sich β_2 -Rezeptoren (Gerber und Nies 1985).

Gewebe	Rezeptor	Wirkung
Herz		
- Sinusknoten	- $\beta_1, (\beta_2)$	Herzfrequenz \uparrow
- AV-Knoten	- $\beta_1, (\beta_2)$	Überleitungsgeschwindigkeit \uparrow
- Atria	- $\beta_1, (\beta_2)$	Kontraktilität \uparrow
- Ventrikel	- $\beta_1, (\beta_2)$	Kontraktilität \uparrow
Arterien	- β_2	Vasodilatation
Venen	- β_2	Vasodilatation
Skelettmuskulatur	- β_2	Vasodilatation, Glykogenolyse, Kontraktilität \uparrow
Leber	- β_2	Glykogenolyse, Glukoneogenese
Bronchien	- β_2	Bronchodilatation
Niere	- β_1	Freisetzung von Renin
Uterus	- β_2	Relaxation
Magen-Darm-Trakt	- β_2	Relaxation
Nervenendigungen	- β_2	Förderung der Noradrenalinfreisetzung

Tabelle 1 Durch β_1 - und β_2 - Rezeptoren vermittelte Wirkungen (modifiziert nach (Lopez-Sendon et al. 2004))

Beide β -Rezeptoren sind über das stimulierende G-Protein (G_s) mit einer Adenylatcyclase gekoppelt, die das Substrat MgATP zu cAMP umwandelt. Das cAMP ist ein positiv inotrop und chronotrop wirkender second messenger, welcher zusätzlich stark wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt (Bristow 2000). Zur Aktivierung der β -Rezeptoren im Körper kommt es durch Bindung der Agonisten und Katecholamine Epinephrin (Adrenalin) und Norepinephrin

(Noradrenalin). Die Medikamentengruppe der β -Blocker hemmt kompetitiv die Bindung der Katecholamine und anderer β -Sympathomimetika an den β -Rezeptoren (Reiter 2004).

Bisoprolol besitzt mit 90% eine sehr hohe Bioverfügbarkeit (Lancaster und Sorkin 1988) und wird sehr schnell und nahezu vollständig aus dem Verdauungstrakt resorbiert. Die Metabolisierung und Elimination erfolgt gleichmäßig über Niere und Leber, wobei ein deutlicher First-Pass Effekt zu verzeichnen ist (Reiter 2004). Die Wirkung von β -Blockern auf den Organismus ist sehr vielfältig und ergibt sich aus den einzelnen Rezeptorwirkungen. Hier eine kurze Übersicht von wichtigen Wirkungen der β -Blocker auf die kardiale Funktion:

- Erhöhung der myokardialen Sauerstoffversorgung über Senkung der Herzfrequenz und
- Verbesserung der Perfusion der Koronararterien aufgrund einer verlängerten diastolischen Füllphase (Frishman 1983)
- Senkung der Renin-Sekretion und somit der Produktion von Angiotensin II und Aldosteron durch Blockierung der β_1 -Rezeptoren am juxtaglomerulären Apparat (Lopez-Sendon et al. 2004)
- Verbesserung der linksventrikulären Funktion und Erhöhung der Ejektionsfraktion (Bristow 1993)

Im klinischen Alltag wird Bisoprolol in der Behandlung von arterieller Hypertonie, der koronaren Herzkrankheit und der Herzinsuffizienz angewendet (Lancaster und Sorkin 1988; Reiter 2004).

1.3 Definition und Einteilung der untersuchten Erkrankungen

1.3.1 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie wird als einer der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gesehen. In den Leitlinien der European Society of Hypertension (ESH) und der European Society of Cardiology (ESC) aus dem Jahr 2013 erfolgt die Definition der Hypertonie ab einem systolischen Wert $>140\text{mmHg}$ und/oder einem diastolischen Wert von $>90\text{mmHg}$ (Mancia et al. 2013). Diese Schwellenwerte sollten jedoch als flexible Richtwerte angesehen und im Zusammenhang mit dem allgemeinen kardiovaskulären Risiko bewertet werden. In der nachfolgenden Tabelle ist die Stufeneinteilung der arteriellen Hypertonie anhand der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte zusammengefasst:

Kategorie	Systolisch [mmHg]		Diastolisch [mmHg]
Optimal	< 120	und	< 80
Normal	$120 - 129$	und/oder	$80 - 84$
Hochnormal	$130 - 139$	und/oder	$85 - 89$
Hypertonie Grad I	$140 - 159$	und/oder	$90 - 99$
Hypertonie Grad II	$160 - 179$	und/oder	$100 - 109$
Hypertonie Grad III	≥ 180	und/oder	≥ 110
Isoliert systolische Hypertonie	≥ 140	und	< 90

Tabelle 2 Einteilung der Hypertonieschweregrade (modifiziert nach den Leitlinien 2013 der ESH/ESC (Mancia et al. 2013))

Eine weitere Einteilung erfolgt anhand der Ursache der Hypertonie, wobei zwischen der primären (essenziellen) und der sekundären Hypertonie unterschieden wird. Bei der primären Hypertonie, welche den Großteil an Patienten ausmacht, ist die Ursache für die Blutdruckerhöhung nicht bekannt. Es handelt sich vielmehr um eine multifaktorielle Erkrankung, wobei eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umweltfaktoren als Ursache angesehen werden kann (Carretero und Oparil 2000; Oparil et al. 2003). Die sekundäre Hypertonie ist das Symptom einer potentiell behandelbaren Grunderkrankung. Dabei unterscheidet man zwischen renalen (renoparenchymatös und renvaskulär) und endokrinen Ursachen (Akpunonu et al. 1996).

1.3.2 Koronare DreifäÙerkrankung

Die koronare DreifäÙerkrankung bezeichnet hochgradige Stenosen in den drei HauptgefäÙen der Koronararterien und ist eine Form der koronaren Herzerkrankung. In Abhängigkeit von der Anzahl der verschlossenen GefäÙe spricht man von einer 1-,2-,3- GefäÙerkrankung. Ursächlich sind atherosklerotische Veränderungen der drei großen Koronararterien RCA (Arteria coronaria dextra), RIVA (Ramus interventricularis anterior), RCX (Ramus circumflexus). Anhand des verringerten Durchmessers und des Querschnitts unterscheidet man die Schweregrade einer Stenose:

Grad	Stenose		Beschreibung
	Längsdurchmesser	Querschnitt	
0	< 25 %	< 44 %	diffuse Koronarsklerose, Konturunregelmäßigkeiten
I	25 – 50 %	45 – 70 %	geringgradige Stenose
II	50 – 75 %	75 – 94 %	mittelgradige Stenose
III	75 – 90 % und > 90 %	94 – 99 % und > 99	Hochgradige bzw. kritische Stenose
IV	100 %		Kompletter GefäÙverschluss

Tabelle 3 AHA-Einteilung von Koronarstenosen (Austen et al. 1975)

Die Durchblutung des Myokards bleibt oft in Ruhe auch bei hochgradigen Stenosen ausreichend. Erst bei einer Verringerung des Querdurchmessers von > 90% nimmt in Ruhe die Durchblutung auf einen kritischen Wert ab, bei Belastung ab einem Wert von > 70 % (Fioretti et al. 1992). Zum Ausgleich des sich bildenden GefäÙverschluss, kommt es häufig zur Entwicklung von Kollateralen, die das betroffene Myokardareal überbrückend versorgen können (Rentrop et al. 1989). Eine hämodynamische Bedeutung entwickelt eine Stenose ab einer Verringerung des Längsdurchmessers von mehr als > 50% oder einer Flächenstenose von > 70%, dabei spricht man von einer relevanten Koronarstenose.

1.3.3 Hyperlipidämie

Die Hyperlipidämie oder auch Hyperlipoproteinämie (HLP) bezeichnet im Allgemeinen eine erhöhte Konzentration der Lipoproteine, des Cholesterins und der Triglyzeride, wobei es zu einer Verschiebung des relativen Anteils der LDL- bzw. VLDL- Fraktion im Blut kommt. Es wird zwischen einer primären und sekundären HLP unterschieden. Primäre HLP sind meist genetisch bedingt und stellen eine eigene Erkrankung dar. Die sekundäre HLP stellt eine Folgeerscheinung von Grunderkrankungen dar. Sie kann unter anderem bedingt sein durch:

- Adipositas
- exzessiven Alkoholkonsum
- nephrotischen Syndrom
- chronischen Nierenversagen
- Hypothyreose
- Fehlernährung
- Einnahme verschiedener Medikamente (β -Blocker, Diuretika, Glukokortikoide, orale Kontrazeptive) (Stone 1994).

Die primären Hyperlipidämien werden mithilfe der Fredrickson-Klassifikation unterschieden. Die Einteilung erfolgt anhand der Werte für Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Triglyceride und orientiert sich an der Färbung des Nüchternserums sowie am Ergebnis der Gelelektrophorese (Lipidelektrophorese). Die Einteilung nach Fredrickson unterscheidet 5 Typen der primären Hyperlipidämie (Fredrickson und Lees 1965):

- Hyperlipoproteinämie Typ 1: Hyperchylomikronämie
- Hyperlipoproteinämie Typ 2: Hypercholesterinämie
 - Typ 2a: isolierte Erhöhung von LDL
 - Typ 2b: gemischte Hyperlipidämie
- Hyperlipoproteinämie Typ 3: Remnant-Hyperlipidämie, Broad-beta-Disease
- Hyperlipoproteinämie Typ 4: Hypertriglyceridämie
- Hyperlipoproteinämie Typ 5: Kombinierte Hyperlipidämie, (endogen-exogene-Hypertriglyceridämie)

1.3.4 Diabetes mellitus Typ II

Der Begriff Diabetes mellitus beschreibt Erkrankungen verschiedener Ätiologie, die im Zusammenhang mit gestörten Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel stehen. Gekennzeichnet sind diese Stoffwechselerkrankungen durch eine chronische Hyperglykämie, die auf einen absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht. Diese Störung kann sowohl in der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder in beiden gemeinsam liegen. Klassische Symptome des Diabetes mellitus, welche meist zur Diagnose führen sind Polyurie, Polydipsie, Sehstörungen oder Gewichtsverlust trotz Hunger. Allerdings kann es auch zu lebensbedrohlichen Symptomen in Form der Ketoazidose oder der hyperosmolaren Hyperglykämie kommen, welche zu Koma oder sogar bei fehlender rechtzeitiger Behandlung bis zum Tod führen können. Folgeschäden der Erkrankung manifestieren sich meist nach

längerer Krankheitsdauer in Form von Mikro- und Makroangiopathien, welche u.a. zu Nephropathien, Retinopathie oder Neuropathien führen können (Alberti und Zimmet 1998). Hauptvertreter dieser Stoffwechselerkrankungen sind der primär insulinabhängige Diabetes mellitus Typ I und der Diabetes mellitus Typ II. Unter der Bezeichnung Diabetes mellitus Typ 3 werden verschiedene Formen des Diabetes mellitus zusammengefasst, die nicht dem Typ 1 oder Typ 2 zuzurechnen sind. Die Einteilung erfolgt anhand der Ursache. Der Typ 4 Diabetes, der sogenannte Gestationsdiabetes, beschreibt eine erstmals während der Schwangerschaft aufgetretene Glukosetoleranzstörung, welche sich in der Regel nach der Geburt des Kindes normalisiert.

Tabelle 4 zeigt einen Überblick der verschiedenen Diabetes Formen:

Diabetes Typ I
Zerstörung der β -Zellen, die meist zum absoluten Insulinmangel führt <ul style="list-style-type: none"> - autoimmunologisch - idiopathisch
Diabetes Typ II
bewegt sich zwischen vorwiegender Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel und vorherrschender sekretorischer Dysfunktion mit oder ohne Insulinresistenz, relevante genetische Komponente
Diabetes Typ III
A. Genetische Defekte der β -Zell-Funktion, B. Genetische Defekte der Insulinwirkung C. Erkrankungen der exokrinen Pankreas D. Endokrinopathien E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert
Diabetes Typ IV
Gestationsdiabetes

Tabelle 4 Klassifikation des Diabetes mellitus (modifiziert nach American Diabetes Association 1997; Alberti und Zimmet 1998; Brückel und Kerner 2006)

1.3.5 Aortenklappenstenose

Die häufigste Ursache für eine Aortenklappenstenose (AS) ist in den industrialisierten Nationen mit einem Anteil von 2-7% bei dem über 65-Jährigen die sogenannte degenerative kalzifizierende Aortenklappenstenose (Lindroos et al. 1993; Vahanian et al. 2012). Die Aortensklerose, welche die Vorstufe der Stenose darstellt, ist schon bei 25-30% der über 65-Jährigen nachweisbar (Otto et al. 1999; Faggiano et al. 2003). Die Entwicklung einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose wurde längere Zeit als ein degenerativer Prozess angesehen, vielmehr ist es aber ein Prozess ähnlich der Atherosklerose. Dazu gehören u.a. die Risikofaktoren wie Hypertonie, Rauchen und Hyperlipidämie (Skowasch et al. 2006) sowie

Entzündungsprozesse, Lipidinfiltration und dystrophe Kalzifizierung (Mohler et al. 2001; O'Brien et al. 1996). Weitere Ursachen, welche jedoch wesentlich seltener auftreten, stellen zum einen an zweiter Stelle die kongenitalen Vitien (z.B. bikuspidale AS) und die postreumatischen Vitien dar (Daniel et al. 2006). Die normale Klappenöffnungsfläche beträgt 2-4 cm². Die Degeneration ist ein progredienter Prozess mit einem Verlust von ca. 0,1cm² pro Jahr (Otto et al. 1989). Die Einteilung der Schweregrade erfolgt anhand von dopplerechokardiographischen Messungen. Dabei erhält man den mittleren Druckgradienten und die mittels Kontinuitätsgleichung berechnete Öffnungsfläche der Aortenklappe (Daniel et al. 2006).

Stenosegrad	mittlerer Druckgradient	Klappenöffnungsfläche	v _{max} der Jetgeschwindigkeit
leicht	< 25 mmHg	> 1,5 cm ²	< 3,0 m/s
mittelschwer	25 - 50 mmHg	1,0 - 1,5 cm ²	3,0 - 4,0 m/s
schwer	> 50 mmHg	< 1,0 cm ² (< 0,6 cm ² /m ²)	> 4,0 m/s

Tabelle 5 Schweregradeinteilung der Aortenklappenstenose (Baumgartner et al. 2009)

2 Frage- und Zielstellung

Im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung von mesenchymalen Stammzellen ist es von Interesse den Einfluss von Erkrankungen und Medikation des Spenders auf die Eigenschaften der Stammzellen zu erfassen. Die Fragestellung der Arbeit bestand konkret darin, ob Proliferation und spontane osteogene Differenzierung der isolierten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark von Erkrankungen und Medikation abhängen. Dazu sind zunächst die Eigenschaften des Spenderpools erfasst und Häufigkeiten hinsichtlich der Medikation bzw. Mehrfachmedikation und der Vorerkrankungen bestimmt worden. Zusätzlich ist die Altersverteilung und die OP-Indikation in diesem Zusammenhang ermittelt worden. Für die Zielstellung der Arbeit, die in der Erfassung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Erkrankungen oder Medikation und biologischen Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen bestand, wurden statistische Auswertungen angewendet, die auf dem Chi-Quadrat Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher, sowie der binären Regressionsanalyse beruhten.

3 Material und Methoden

Die in der Arbeit durchgeführten statistischen Analysen wurden auf Ergebnisse angewendet, die im Rahmen experimenteller Untersuchungen gewonnen wurden, die routinemäßig im Arbeitsbereich Zellbiologie in den vergangenen Jahren im Rahmen verschiedener Drittmittelprojekte durchgeführt wurde. Im Folgenden werden diese Verfahren näher erläutert.

3.1 Zellgewinnung

Bei den hier auf Einflussfaktoren untersuchten Zellen handelt es sich um mesenchymale Stammzellen. Für die Präparation der MSC im Arbeitsbereich Zellbiologie für experimentelle Zwecke wurden Knochenmarksspenden von Patienten aus der Klinik für Herzchirurgie (Universitätsmedizin Rostock) zur Verfügung gestellt. Das Knochenmark wurde mithilfe einer Hohlnadel mit Mandrin während einer medianen Sternotomie entnommen. Um Koagulation zu verhindern, wurde das Knochenmark mit PBS/EDTA verdünnt (1:2). Anschließend wurde das Knochenmark in Pancoll Röhrchen überführt. Diese enthielten Ficoll mit einer Dichte von 1,007 g/ml. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur, für 15 min mit 800g (ohne Bremse). Danach wurde die milchig weiße Lymphozytenfraktion entnommen und mit PBS gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS und 1 % AB/AM aufgenommen. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter standardisierten, konstanten Bedingungen bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Nach 1 bis 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel durch die nicht adhärente Zellen entfernt wurden.

3.2 Zellpassage

Die Zellen wurden bei 80 % Konfluenz passagiert. Das Kulturmedium wird hierfür abgezogen und der Zellrasen mit PBS gespült. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin für 5 min im Brutschrank inkubiert. Um Trypsin zu inaktivieren, werden die Zellen in serumhaltigem Medium aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Zwecks Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in einem definierten Volumen resuspendiert.

3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit dem Zellzählgerät Casy der Firma Schärfe Systems bestimmt. Die CASY®-Technology basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Zellen mit intakter Zellmembran schließen den elektrischen Strom aus und generieren ein Signal, das vom Volumen der Zelle abhängt (Electrical Current Exclusion, ECE®). Tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran können den Strom nicht mehr

ausschließen und werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst. Die eigens für die CASY®-Technology entwickelte „Pulsflächenanalyse“ ist eine digitale Signalauswertung mit einer Million Messpunkten pro Sekunde. Die erzielte hohe Auflösung stellt sicher, dass vitale Zellen von toten Zellen getrennt erfasst werden und dass das CASY® einen sehr großen Messbereich abdeckt. Zur Messung werden von der Zellsuspension 100 µl abgenommen und in ein Messgefäß mit 10 ml Casytone -Lösung geben und gezählt.

3.4 Charakterisierung von Proliferation der Zellen in vitro

Die Einteilung der Proliferation erfolgte in zwei Kategorien:

- **Ja:** Diese Patientenzellen zeigten eine Proliferation. Zwischen dem 3-7 Tag nach Aussaat waren mittels Lichtmikroskopie CFU's (Colony forming units) sichtbar

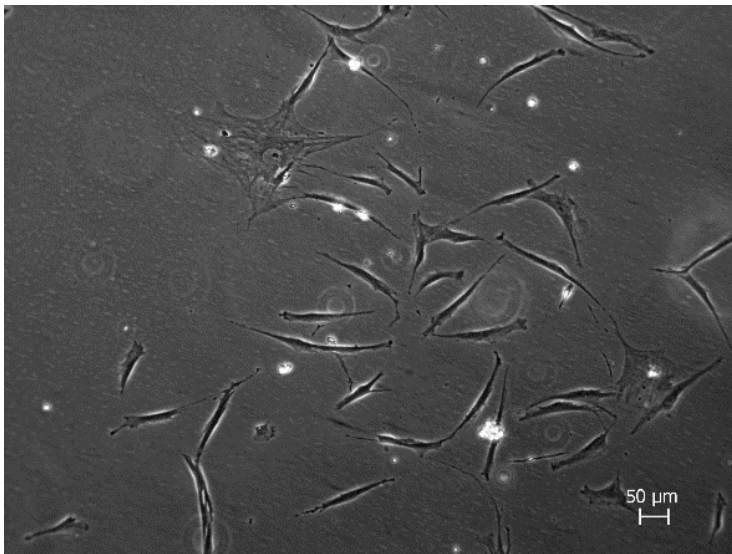


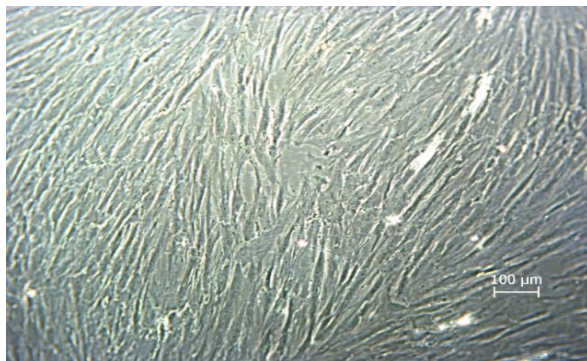
Abbildung 1 lichtmikroskopische Darstellung der CFU's (bereitgestellt aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie der Universität Rostock)

- **Nein:** Diese Patientenzellen zeigten eine geringe (0-2 Zellen) oder gar keine Proliferation. Es kam innerhalb von 7 Tagen zu keiner Bildung von CFU's.

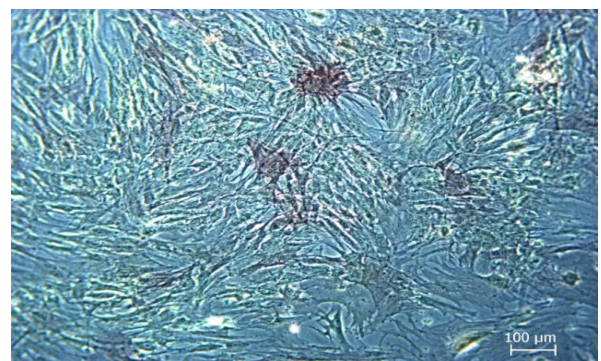
3.5 Test auf Aktivität der alkalischen Phosphatase mittels Fast red Färbung

Das Prinzip des Testes beruht darauf, dass der alkalischen Phosphatase (ALP) organische Phosphatverbindungen als Substrat angeboten werden. Die aktive ALP spaltet Phosphat ab und die freigesetzte Verbindung, hier Naphthol AS, reagiert mit Fast red zu einem unlöslichen Azofarbstoff. Der Test auf ALP Aktivität mittels Fast red Färbung erfolgte zum Zeitpunkt der 1. Passage der Zellen bei 80 % Konfluenz. Die Färbelösung besteht aus 60 mM 2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol 0,1 % Fast red violett LB Salt und 0,1 % Naphthol AS-Mix phosphat. Osteoblasten weisen in der Phase der Matrixbildung ALP auf. Für den Nachweis wurden 2,5 x

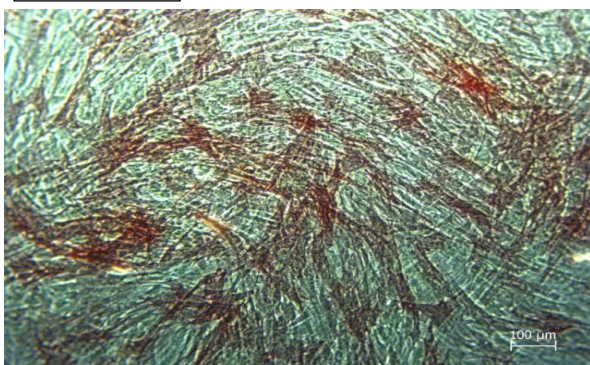
10⁴ Zellen in Petrischalen (d = 3,5 cm) mit 2,5 ml Kulturmedium ausgesät und 24 h im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Positivkontrolle wurden Saos-2 (sarcoma steogenic) Zellen mitgeführt, die ein deutliches ALP Signal zeigen. Nach 24 h wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit PFA (4 %) für 10 Minuten überschichtet, um die Zellen zu fixieren. Es wird erneut mit PBS gewaschen und die Zellen werden für 10 min mit der Fast red Lösung überschichtet. Die gefärbten Zellen werden lichtmikroskopisch beurteilt. Das Fehlen der ALP Aktivität wird von uns als ein Merkmal der undifferenzierten mesenchymalen Stammzelle betrachtet. Vorhandene ALP ist ein Merkmal von Zellen, die eine osteogene Differenzierung durchlaufen. Lag nur eine geringe Anzahl an positiven Zellen vor, wurden die isolierten Zellen der ALP+ (mäßige Aktivität) Gruppe zugeordnet. Wies die Zellpräparation einen hohen Anteil an positiven Zellen auf, wurde diese der ALP++ (starke Aktivität) Gruppe zugeteilt. Bei keiner Aktivität erfolgte die Zuordnung der Zellen zu ALP- (keine Aktivität). In den nachfolgenden Graphiken sind die lichtmikroskopischen Darstellungen aufgeführt:



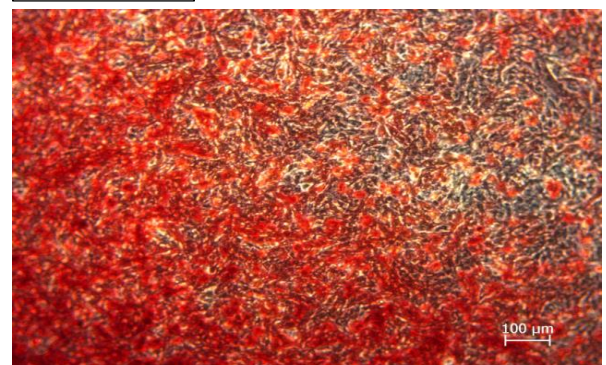
MCS ALP⁻



MCS ALP⁺



MCS ALP⁺⁺



Saos⁺⁺⁺

Abbildung 2 lichtmikroskopische Darstellung der ALP-Aktivitäten (bereitetgestellt aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie der Universität Rostock)

3.6 Erhebung der Patientendaten

Die vorliegende Arbeit ist eine retrospektive Erhebung von Daten aus archivierten Patientenakten der Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Herzchirurgie. Es wurden Informationen hinsichtlich des Geschlechts, des Alters, der Medikamenteneinnahme, der Vorerkrankungen und der OP Indikation herangezogen. Die erhobenen Falldaten wurden im Datenerhebungsprogramm Excel gesammelt und hinsichtlich ihrer Verteilung ausgewertet. Zusätzlich erfolgte die Ergänzung der Zelleigenschaften Proliferation in vitro und ALP-Aktivität anhand von Laboraufzeichnungen. Die Patienten wurden sowohl im Gesamtkollektiv als auch geschlechtsspezifisch untersucht und die Häufigkeiten der einzelnen Daten bestimmt. Die ausführliche statistische Bearbeitung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version IBM SPSS Statistics 22) durchgeführt.

3.7 Probleme bei der Datenerhebung

Es war nicht immer möglich anhand von archivierten Patientenakten und Laboraufzeichnung einen vollständigen Datensatz zu erheben, da die Patientenakten oder auch die Laboraufzeichnungen unterschiedlich ausführlich geführt wurden. Es zeigte sich auch, dass einzelne Patientenakten nicht im Archiv zu finden waren und diese somit nicht aufgeführt werden konnten.

Eine große Vielfalt konnte bei den eingenommenen Medikamenten sowie Vorerkrankungen beobachtet werden. Zur besseren Verarbeitung und Übersichtlichkeit bei der statistischen Auswertung beschränkten wir uns auf die vier am häufigsten vertretenen Medikamente und Vorerkrankungen.

3.8 Statistische Methoden

3.8.1 Datenerhebung mit Excel

Das Sammeln und Ordnen der erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel. Zusätzlich konnten Häufigkeiten und Grafiken erstellt werden. Da die weitere statistische Auswertung mit Excel nicht möglich war, überführten wir die Patientendaten in das Statistikprogramm SPSS.

3.8.2 Datenverarbeitung mit SPSS

Die Analyse und statistische Aufbereitung der umfangreichen Datenmenge erfolgte mittels SPSS in der Version IBM SPSS Statistics 22. Zunächst erfolgte die Erfassung von Häufigkeiten mittels deskriptiver Verfahren und Ermittlung des Mittelwerts, Maximums, Minimums und des Median. Die erhobenen Merkmale sind qualitativ und liegen in einem nominalen Messniveau

vor. Mit den erfassten Daten wurden mithilfe von SPSS sowohl beschreibende als auch schließende statistische Analysen und Tests durchgeführt (Krentz 2005). Dabei handelt es sich im genauen um

- den Chi-Quadrat-Test (χ^2) und
- den Exakten Test nach Fischer.

Die Häufigkeitsverteilung zweier kategorialen Variablen wird dabei auf einen signifikanten Zusammenhang überprüft. Zusätzlich wurde zur genaueren Betrachtung und der Art der Zusammenhänge eine

- binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

3.8.2.1 Der Chi-Quadrat Test und der Exakte Test nach Fischer

Mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests bzw. des Exakten Tests nach Fischer wird in Form von Kontingenztafeln oder Vierfeldertafeln überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen zwei Parametern besteht. In unserem Fall handelt es sich dabei um den Zusammenhang der Faktoren Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme sowie auf der anderen Seite die Zelleigenschaften und Zielvariablen Proliferation in vitro und Ausprägung der spontanen ALP-Aktivität von Zellen. Das Vorhandensein von Vorerkrankungen oder die Einnahme von Medikamenten teilt unsere Stichprobe an Patienten in die zwei Gruppen ja (Vorhandensein einer Erkrankung bzw. Einnahme eines Medikaments) und nein (Nicht-Vorhandensein bzw. Nicht-Einnahme). Dem gegenübergestellt wird die prozentuale Häufigkeit der Ausprägungen von Proliferation (ja oder nein) und der spontanen ALP-Aktivität (keine, mäßig, stark). Besteht ein Zusammenhang dieser Parameter zueinander so erhalten wir einen p-Wert kleiner 0,05. Dabei wird die Aussage getroffen, ob eine Beziehung/Abhängigkeit zwischen den Parametern besteht. Hinsichtlich der genaueren Beschreibung, welche Art von Zusammenhang (Stärke und Richtung der in Beziehung stehenden Parameter) besteht, wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

3.8.2.2 Binär logistische Regressionsanalyse

Damit es uns möglich ist, die Art des Zusammenhangs zwischen unseren Einflussfaktoren und den Zelleigenschaften Proliferation in vitro und Vorhandensein der spontanen ALP-Aktivität genauer zu beschreiben, ist eine binäre Regressionsanalyse durchgeführt worden. Bei einer Regressionsanalyse erhält man die Odds Ratio, das Konfidenzintervall sowie den p-Wert für die statistische Signifikanz.

- Die **Odds Ratio** oder auch das Chancenverhältnis oder der Effektkoeffizient ist hier ein Maß dafür, in wie weit das Vorhandensein von Einflussfaktoren verglichen mit den Patientenzellen ohne Einflussfaktor die Chance erhöht, die Proliferation oder die spontane Aktivität der Alkalischen Phosphatase der mesenchymalen Stammzellen zu verbessern oder zu verschlechtern. Die ermittelte Odds Ratio ist allerdings nur ein Schätzwert bezogen auf unsere vorgegebene und untersuchte Stichprobe an Patienten. In der wissenschaftlichen Forschung werden Stichproben für klinische Studien herangezogen.
- Das **Konfidenzintervall** überdeckt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % den wahren Wert für die Odds Ratio. Mit der Berechnung der Konfidenzintervalle der Odds Ratio wird beurteilt, ob die mit Hilfe von SPSS erhaltenen Ergebnisse signifikant sind. Deshalb wird die Angabe des 95 %-igen Konfidenzintervalls für das Stichproben-Chancenverhältnis herangezogen. Enthält dieses nicht den Wert „1“, nennt man dieses Ergebnis signifikant.
- Der **p-Wert**: Das Signifikanzniveau wird auf 5 % festgelegt. Kleiner als 0,05 auftretende p-Werte werden als signifikant gewertet. Signifikante Ergebnisse sind verallgemeinerbar und auf die Grundgesamtheit übertragbar.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Angaben zum Patientenkollektiv

Insgesamt wurden die Daten von 275 Patienten analysiert. Dabei handelt es sich bei 74 Patienten um Frauen und bei 201 Patienten um Männer. Die Dokumentation von Alter, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und OP-Indikation erfolgt anhand von archivierten Patientenakten. Die Zelleigenschaften Proliferation und spontane Aktivität der Alkalische Phosphatase wurden im Anschluss anhand von Laboraufzeichnungen hinzugefügt.

4.1.1 Altersverteilung des gesamten Patientenkollektivs

Der Mittelwert bei Betrachtung des Alters im Gesamtkollektiv befindet sich bei 66 Jahren. Zum OP-Zeitpunkt war der jüngste Patient 37 Jahre und der Älteste 85 Jahre. Das häufigste Alter war 67 Jahre. Die Standardabweichung beträgt aufgerundet 10 Jahre.

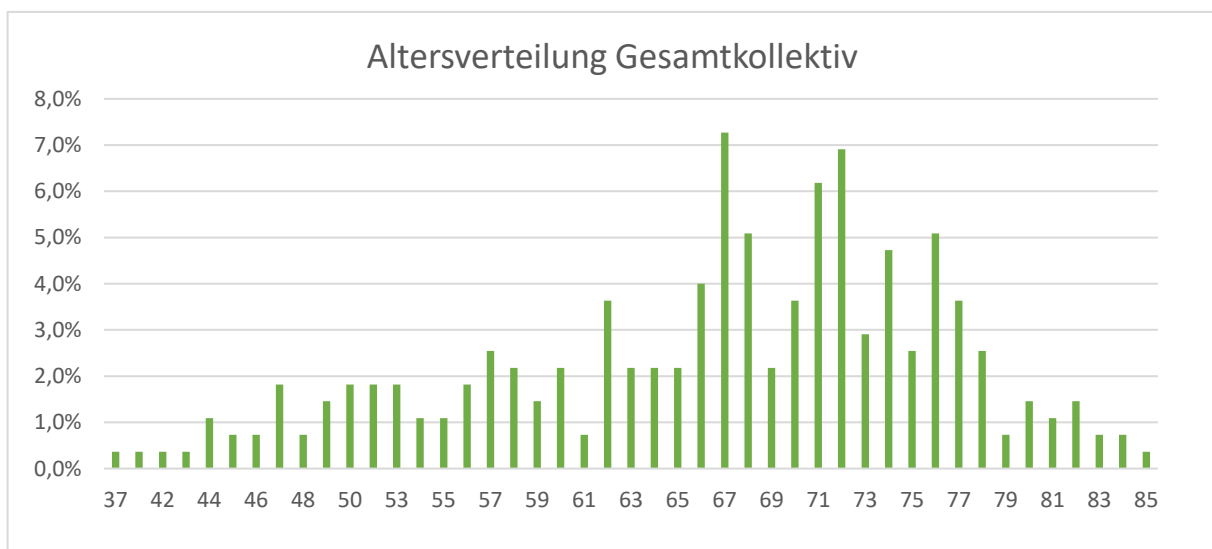


Abbildung 3 Darstellung der Altersverteilung im Gesamtkollektiv

Mittelwert	66,35
Median	68,0
Standardabweichung	9,87
Varianz	97,491
Minimum	37
Maximum	85

4.1.2 Altersverteilung der Frauen

Der Mittelwert bei der Altersverteilung der Frauen befindet sich aufgerundet bei 69 Jahren. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt ihrer OP 38 Jahre alt, die älteste Patientin 83. Der Median liegt bei 72 Jahren. Die Standardabweichung zeigte einen Wert von aufgerundet 10 Jahren. Die meisten Patienten hatten ein Alter zwischen 67 und 76 Jahren. Das häufigste Alter zur OP lag bei 72 Jahren.

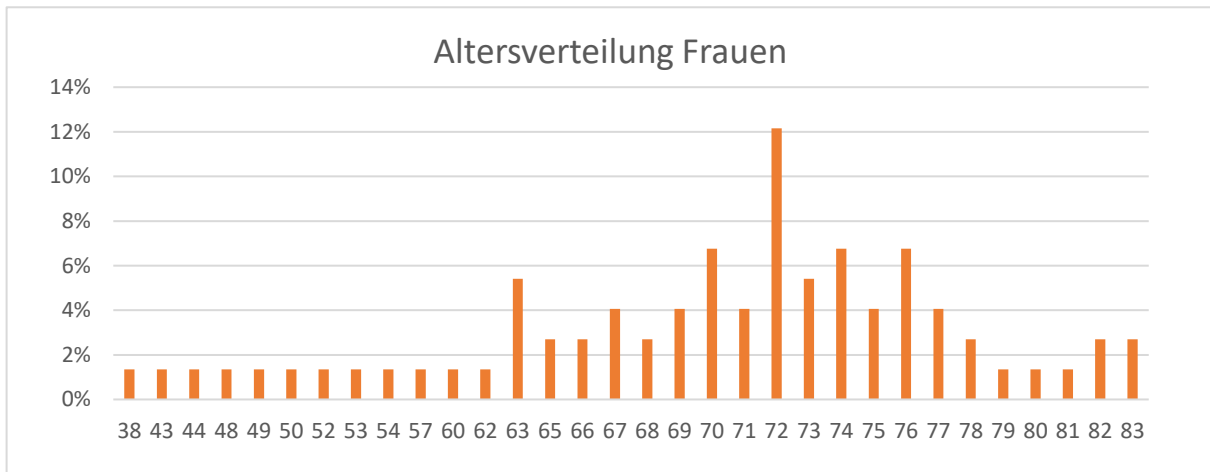


Abbildung 4 Darstellung der Altersverteilung im Frauenkollektiv

Mittelwert	68,96
Median	72,0
Standardabweichung	9,655
Varianz	93,218
Minimum	38
Maximum	83

4.1.3 Altersverteilung der Männer

Bei den Männern lag der Mittelwert des Alters bei 65 Jahren und der Median bei 67 Jahren. Der jüngste Patient im Männerkollektiv war zum Zeitpunkt seiner OP 37 Jahre alt, der älteste 85. Auch hier zeigte sich eine Standardabweichung von aufgerundet 10 Jahren. Der Altersgipfel lag zwischen 66 und 72 Jahren. Das häufigste Alter zum Zeitpunkt der OP lag bei 67 Jahren.

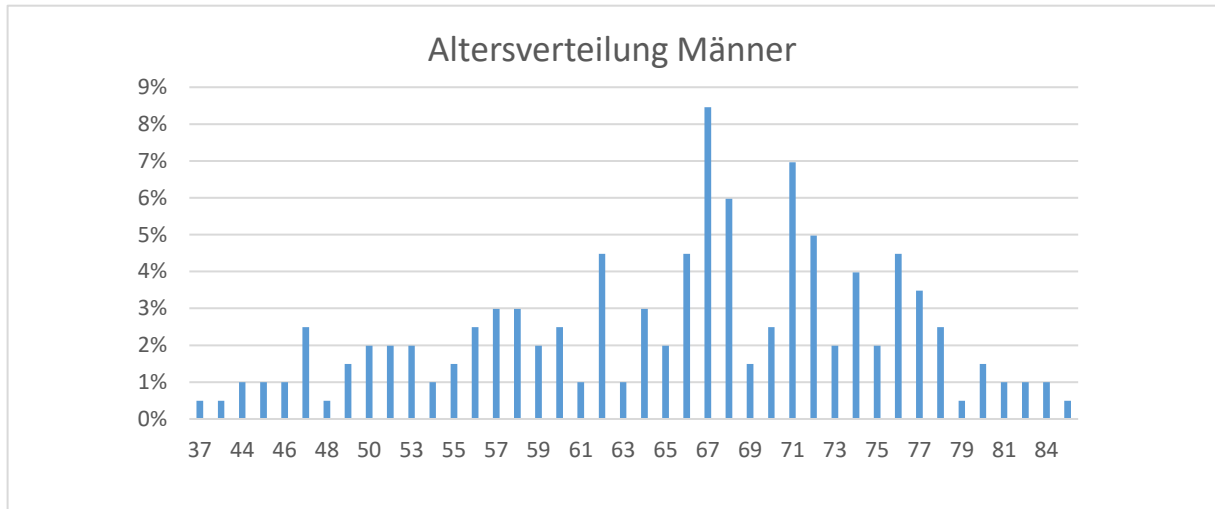


Abbildung 5 Darstellung der Altersverteilung im Männerkollektiv

Mittelwert	65,39
Median	67,0
Standardabweichung	9,802
Varianz	96,089
Minimum	37
Maximum	85

4.1.4 Vorerkrankungen

Im Folgenden werden die vier häufigsten Vorerkrankungen der Patienten näher ausgewertet. Die Vorerkrankungsverteilung zeigt vor allem Komorbiditäten für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

4.1.4.1 Vorerkrankungen des gesamten Patientenkollektivs

Im Gesamtkollektiv der erfassten Patienten ist die häufigste Vorerkrankung die arterielle Hypertonie (n = 218; 79 %). Darauf folgen die koronare DreifäÙerkrankung (n = 157; 57 %), die Hyperlipidämie (n = 134; 49 %) und der Diabetes mellitus (n = 88; 32 %). Weitere oder andere Vorerkrankungen sind zusätzlich noch bei 93 % der Patienten bekannt (n = 256).

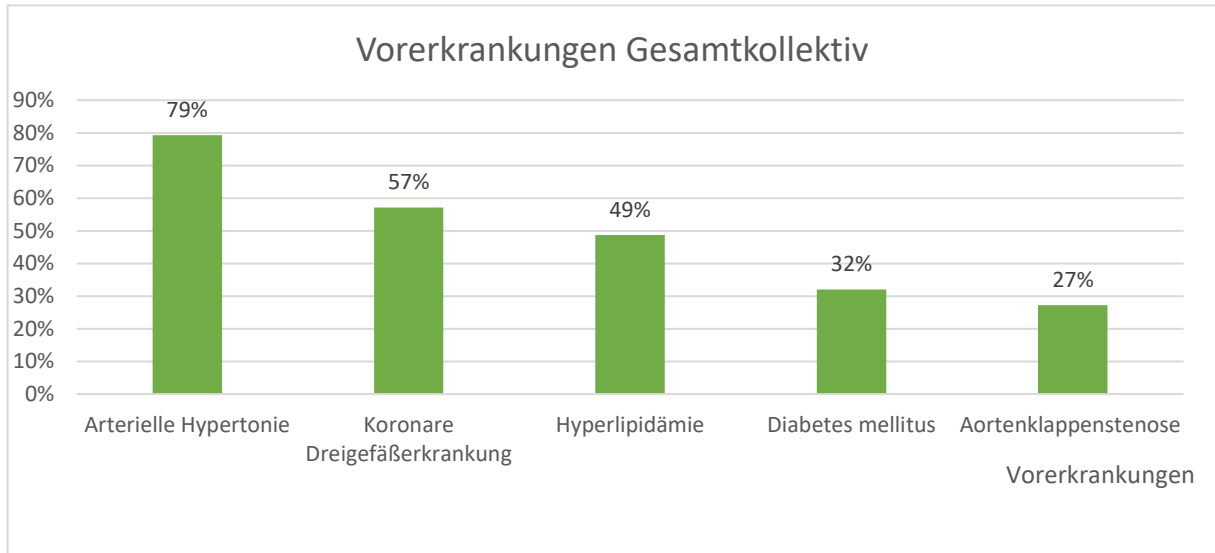


Abbildung 6 Häufigkeitsverteilung der Vorerkrankungen im Gesamtkollektiv

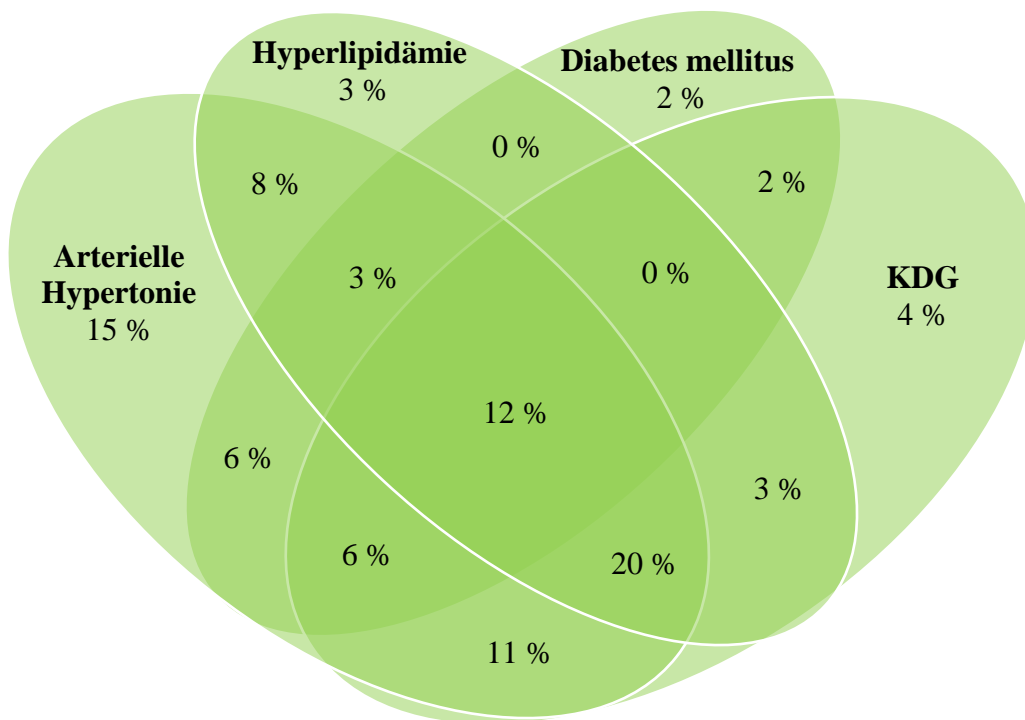


Abbildung 7 Darstellung der Mehrfacherkrankungen im Gesamtkollektiv

4.1.4.2 Vorerkrankungen des Frauenkollektiv

Die meisten Frauen leiden an einer arteriellen Hypertonie (n = 63; 85 %), gefolgt von einer Hyperlipidämie (n = 34; 46 %), der koronaren Dreifäßerkrankung (n = 30; 41 %) und der Aortenklappenstenose (n = 27; 36 %). Bei 91 % waren eine bzw. mehrere zusätzliche Vorerkrankungen bekannt.

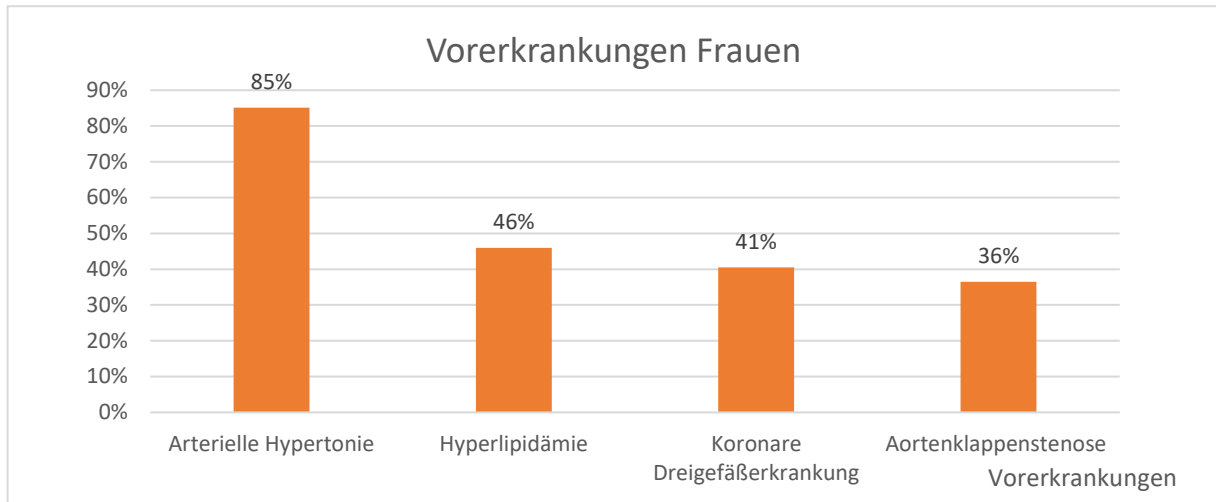


Abbildung 8 Häufigkeitsverteilung der Vorerkrankungen der Frauen

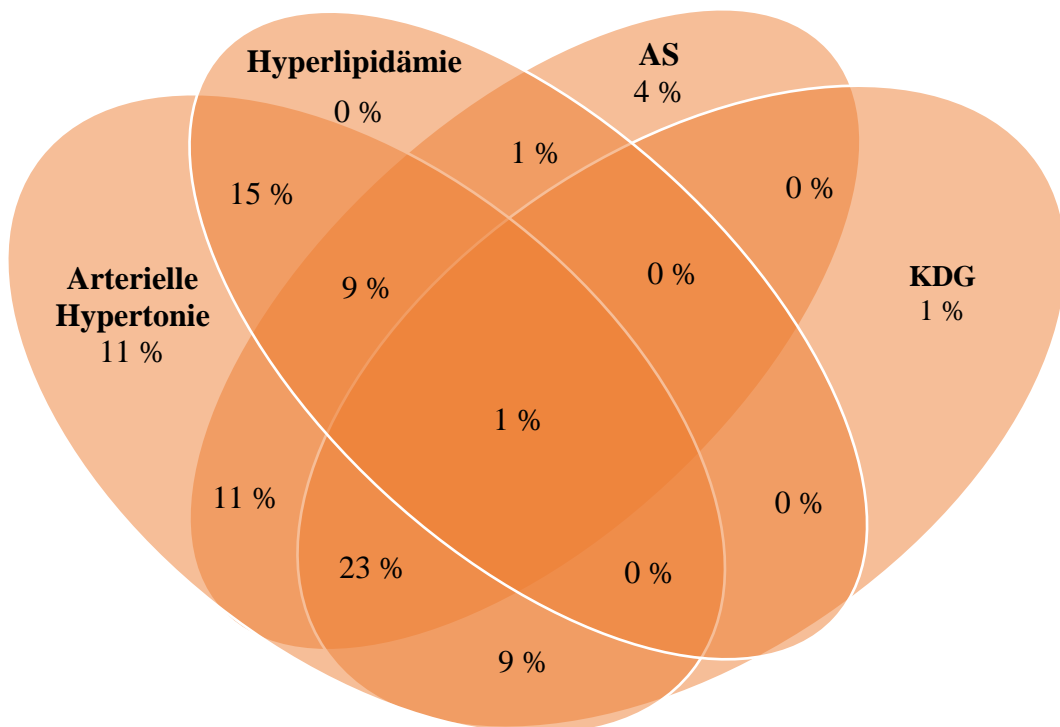


Abbildung 9 Darstellung der Mehrfacherkrankungen der Frauen

4.1.4.3 Vorerkrankungen des Männerkollektiv

Bei den Männern leiden die meisten Patienten an einer arteriellen Hypertonie (n = 155; 77 %), gefolgt von der koronaren Dreifäßerkrankung (n = 155; 63 %), Hyperlipidämie (n = 100; 50 %) und dem Diabetes mellitus (n = 64; 32 %) Weitere oder mehrere Vorerkrankungen sind bei 189 (94 %) Patienten aus dem Kollektiv der Männer bekannt.

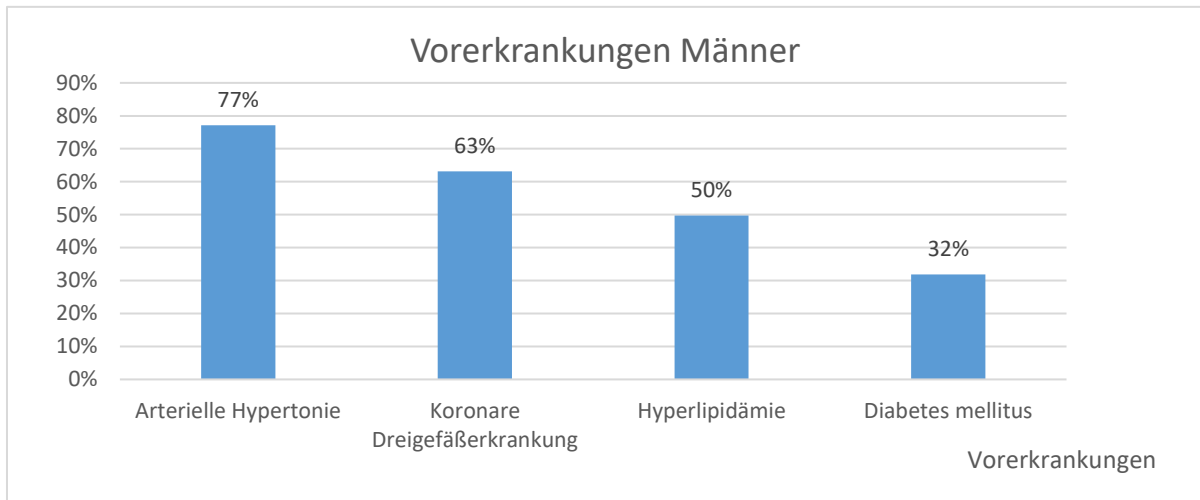


Abbildung 10 Häufigkeitsdarstellung der Vorerkrankungen im Männerkollektiv

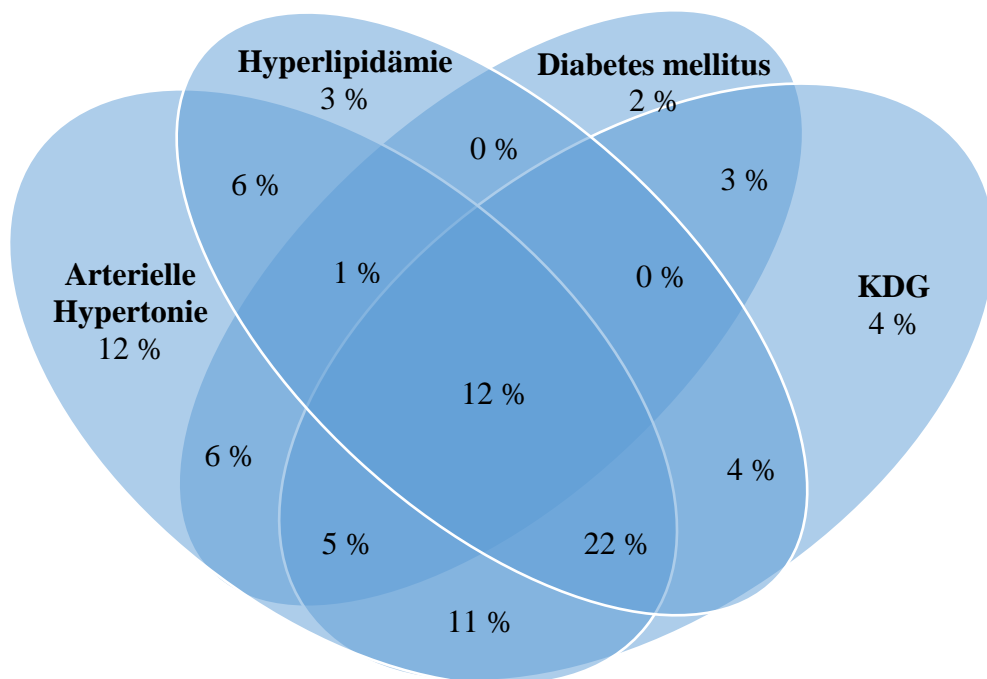


Abbildung 11 Darstellung der Mehrfacherkrankungen der Männer

4.1.5 Medikamenteneinnahme

4.1.5.1 Medikamenteneinnahme des gesamten Patientenkollektivs

Im gesamten Patientenkollektiv war die Einnahme von Simvastatin mit 68 % (n = 187) am häufigsten. Darauf folgend sind die Medikamente ASS (n = 150; 55 %), Ramipril (n = 120; 44 %) und Bisoprolol (n = 118; 43 %).

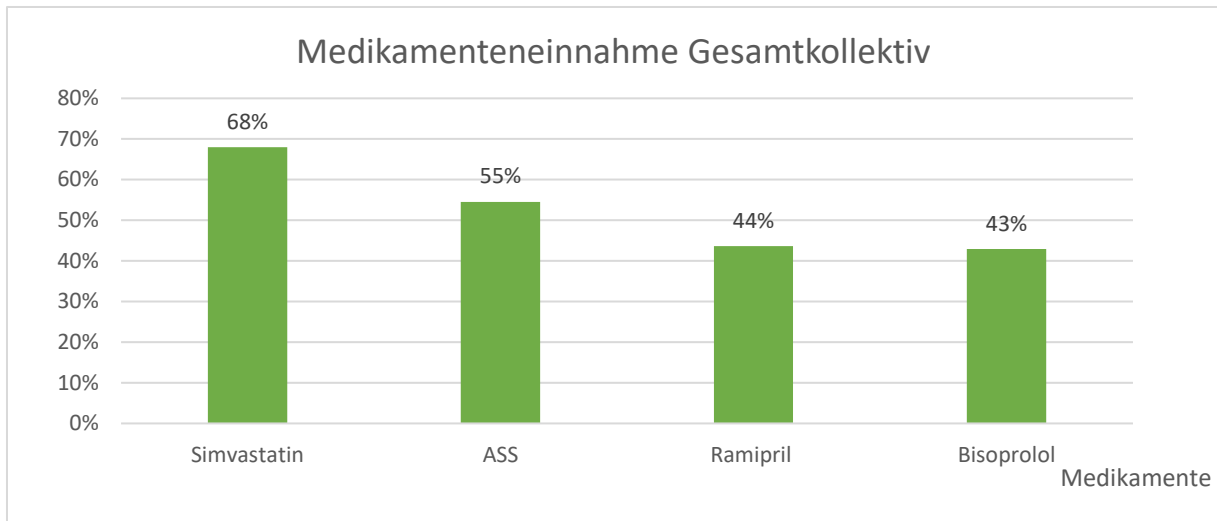


Abbildung 12 Häufigkeitsverteilung der Medikamenteneinnahme im Gesamtkollektiv

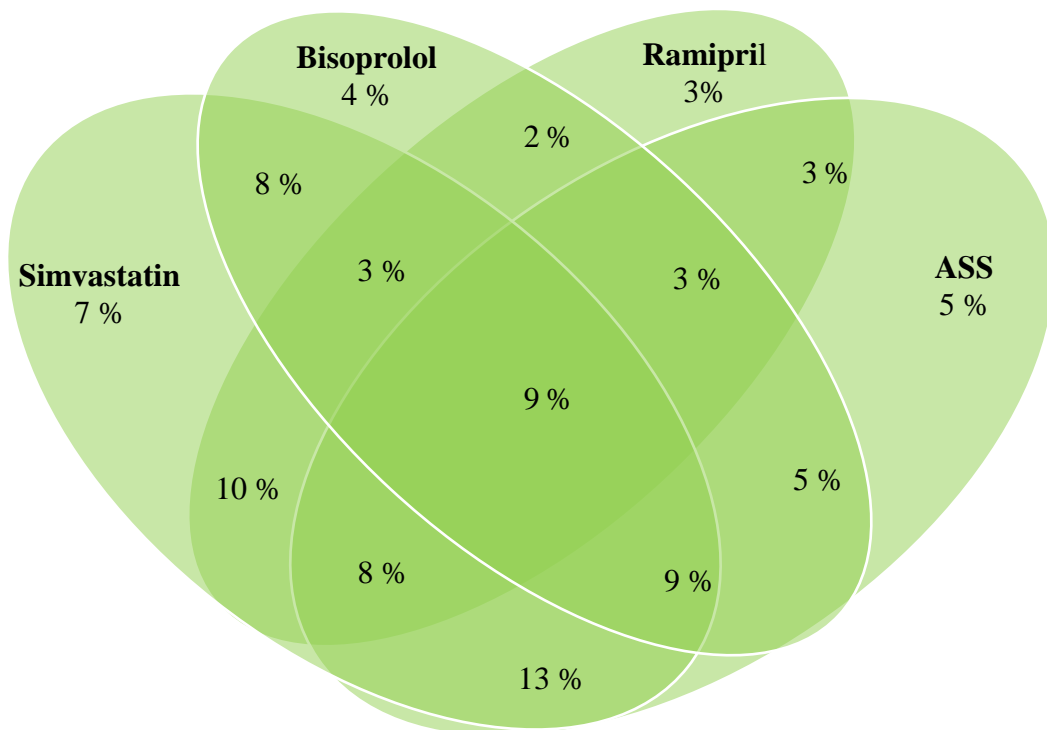


Abbildung 13 Darstellung der Mehrfachmedikation im Gesamtkollektiv

4.1.5.2 Medikamenteneinnahme des Frauenkollektiv

Die vier Häufigsten eingenommenen Medikamente bei den Frauen sind Simvastatin (n = 46; 62 %), Bisoprolol (n = 39; 53 %), Ramipril (n = 34; 46 %) und ASS (n = 29; 39 %). Weitere oder andere Medikamente wurden noch von 70 Patienten (95 %) eingenommen.

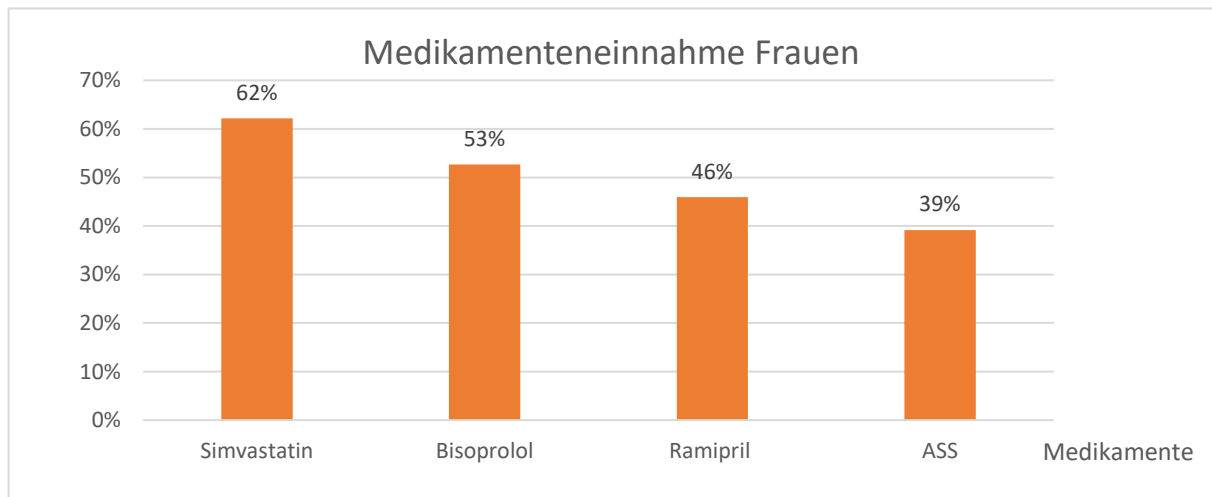


Abbildung 14 Häufigkeitsverteilung der Medikamenteneinnahme im Frauenkollektiv

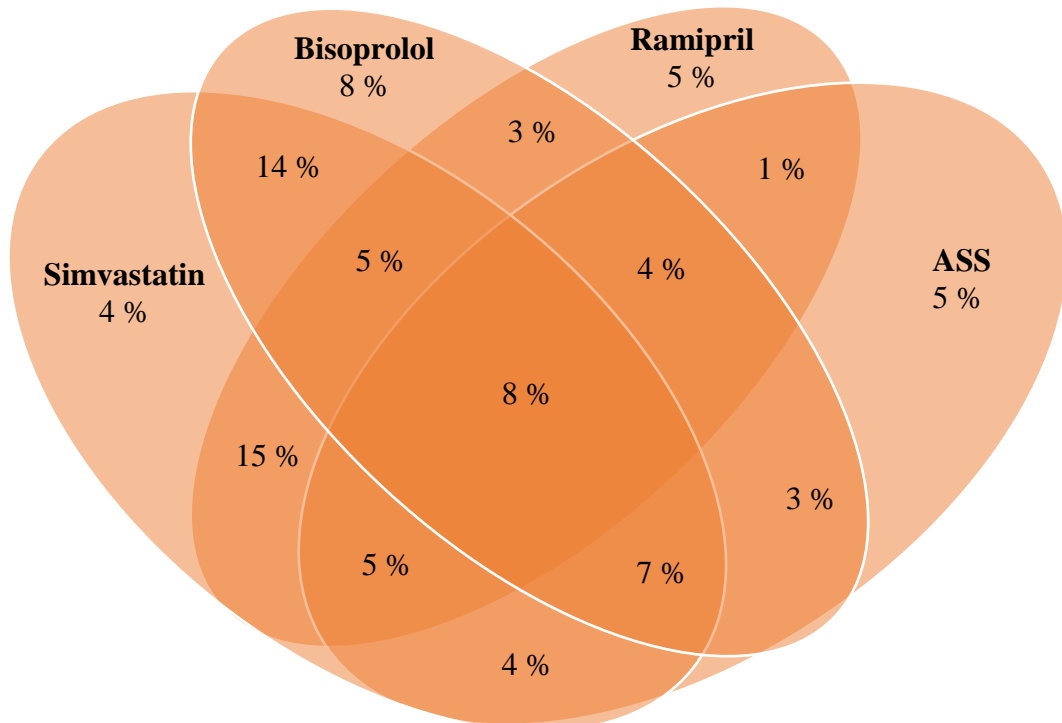


Abbildung 15 Darstellung der Mehrfachmedikation im Frauenkollektiv

4.1.5.3 Medikamenteneinnahme des Männerkollektiv

Auch bei den Männern war das Medikament Simvastatin (n = 141; 70 %) am häufigsten vertreten, gefolgt von ASS (n = 121; 60 %), Ramipril (n = 86; 43 %) und Bisoprolol (n = 79; 39 %). Weitere Medikamente nahmen noch insgesamt 192 Patienten (96 %) ein.

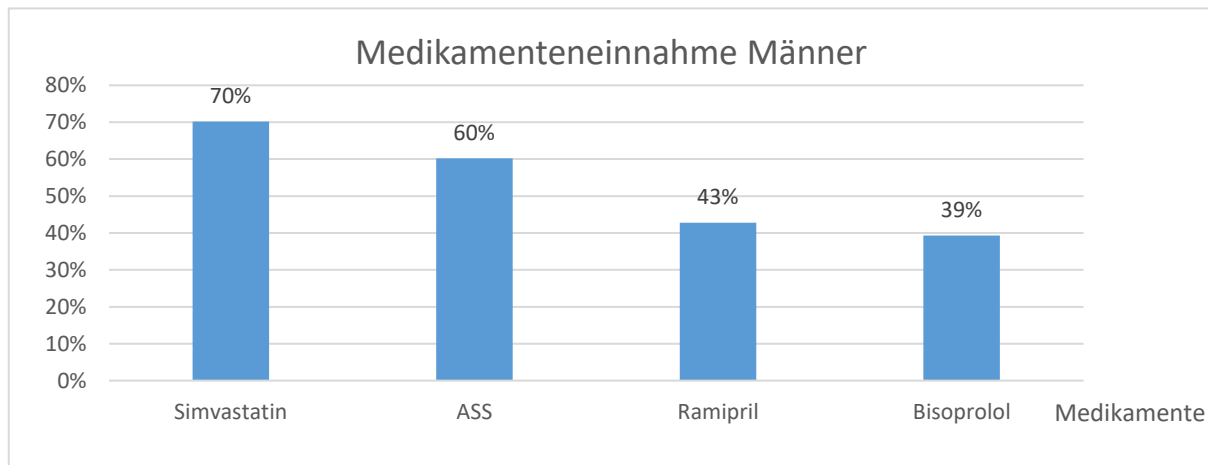


Abbildung 16 Häufigkeitsverteilung der Medikamenteneinnahme im Männerkollektiv

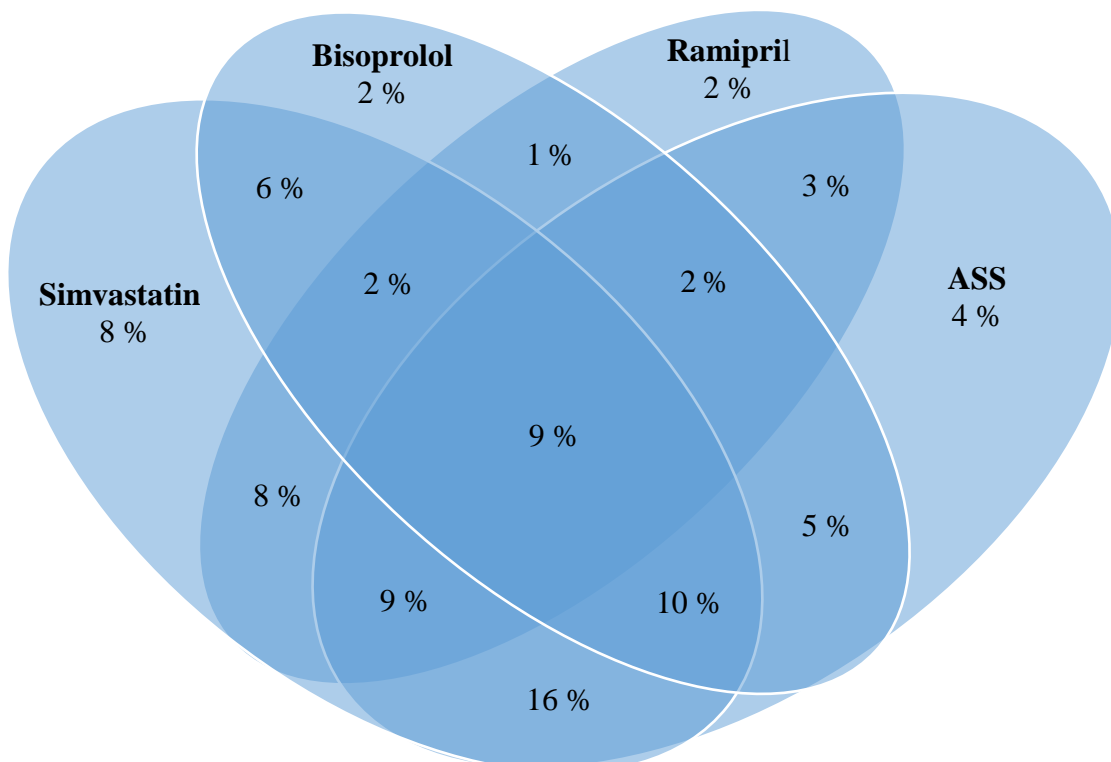


Abbildung 17 Darstellung der Mehrfachmedikation im Männerkollektiv

4.1.6 OP-Indikation

Die OP-Indikationen wurden anhand der Entlassedikrisen bestimmt und sind im folgenden Abschnitt grafisch dargestellt.

4.1.6.1 OP-Indikation im Gesamtkollektiv

Im Gesamtkollektiv zeigte sich die koronare DreifäÙerkrankung (n = 123; 45 %) als häufigste OP-Indikation. Danach folgten die Aortenklappenstenose (n = 67; 24 %), die koronare Herzkrankheit (n = 53; 19 %) und gleichauf die Mitralklappeninsuffizienz (n = 37; 13 %) und die Aortenklappeninsuffizienz (n = 37; 13 %).

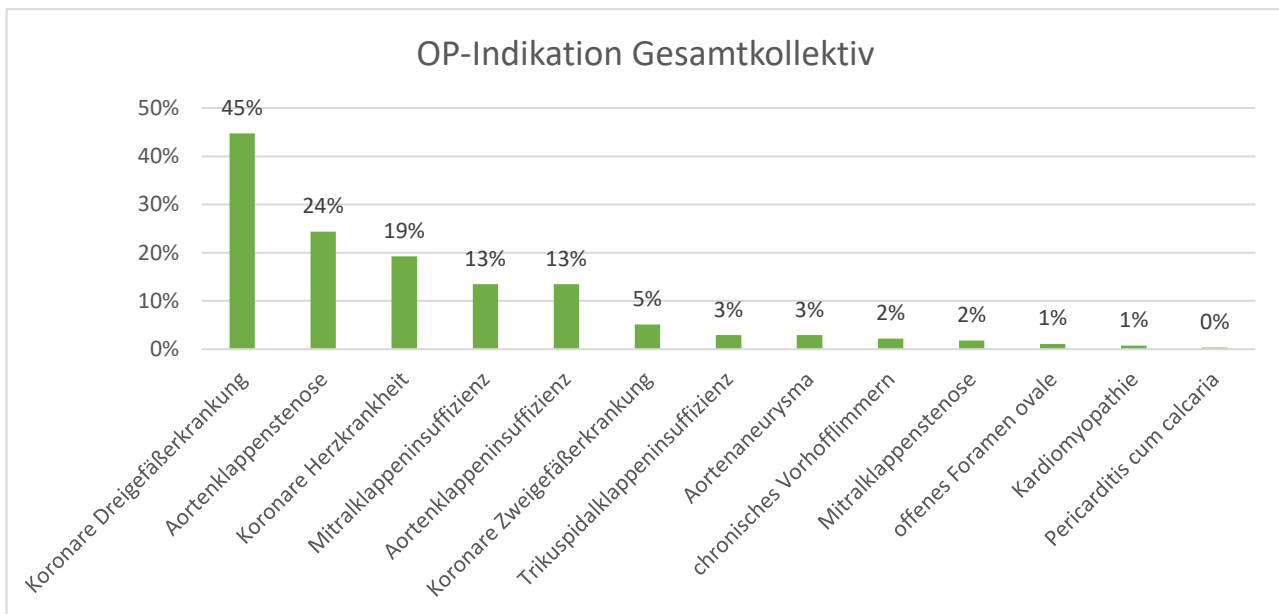


Abbildung 18 OP-Indikationen im Gesamtkollektiv

4.1.6.2 OP-Indikation des Frauenkollektivs

Die häufigsten OP-Indikationen waren die Aortenklappenstenose (n = 25; 34 %), die koronare Dreifäßerkrankung (n = 23; 31 %), die Mitralklappeninsuffizienz (n = 11; 15 %) und die koronare Herzkrankheit (n = 9; 12 %). Alle weiteren OP-Indikationen sind in der Grafik aufgeführt.

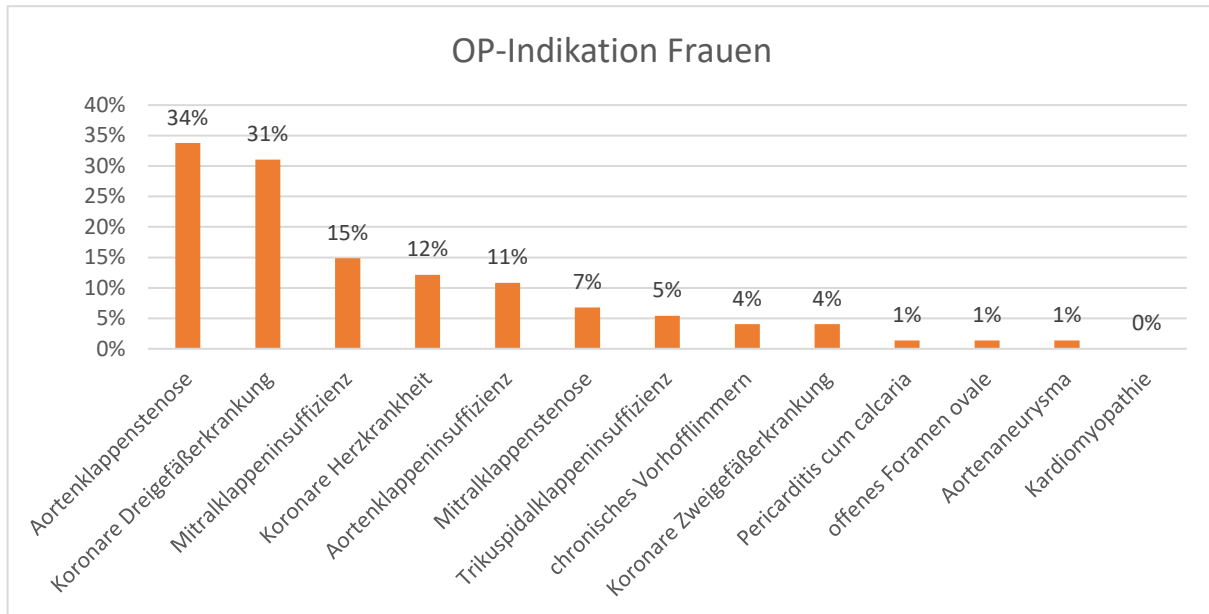


Abbildung 19 OP-Indikationen im Frauenkollektiv

4.1.6.3 OP-Indikation des Männerkollektivs

In der folgenden Grafik werden die OP-Indikationen der Männer aufgeführt. Hauptindikation war eine koronare Dreifäßerkrankung (n = 100; 50 %), gefolgt von Aortenklappenstenose (n = 44; 22 %), Koronarer Herzkrankheit (n = 42; 21 %) und der Aortenklappeninsuffizienz. (n = 29; 14 %).

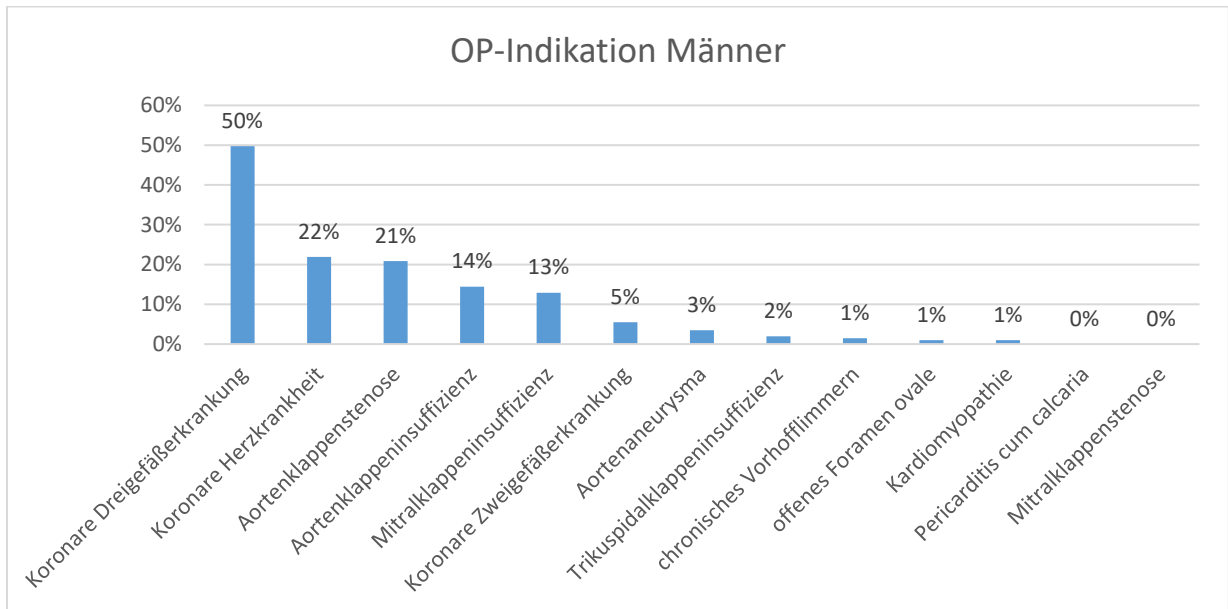


Abbildung 20 OP-Indikation im Männerkollektiv

4.2 Zusammenhang zwischen der Proliferation der Zellen in vitro und den Krankheiten sowie Medikation

Zunächst ist mithilfe des Chi-Quadrat Tests überprüft worden, ob ein Zusammenhang zwischen Medikamenten bzw. Vorerkrankungen und der Proliferation der mesenchymale Stammzellen in vitro besteht. Dies erfolgte sowohl im gesamten Patientenkollektiv als auch in Aufteilung nach Geschlechtern. Die Ergebnisse sind in Tabellen dargestellt. Die Angabe der statistischen Signifikanz erfolgt mithilfe des p-Werts. Eine statistische Signifikanz besteht definitionsgemäß bei einem p-Wert von $p < 0,05$.

4.2.1 Proliferation der Zellen im Gesamtkollektiv

Insgesamt wurden die Daten von 275 Patienten ausgewertet. Der überwiegende Teil der Zellen zeigt in vitro mit 61,8 % eine gute Proliferation. Bei 38,2 % konnte hingegen keine ausreichende Proliferation beobachtet werden.

Einflussfaktoren	Proliferation (n = 275)		p-Wert
	Nein n = 105 (38,2 %)	Ja n = 170 (61,8 %)	
Arterielle Hypertonie	81 (37,2 %)	137 (62,8 %)	0,541*
Hyperlipidämie	49 (36,6 %)	85 (63,4 %)	0,621*
Koronare Dreifäßerkrankung	57 (36,3 %)	100 (63,7 %)	0,531*
Diabetes mellitus	30 (34,9 %)	56 (65,1 %)	0,505*
Aortenklappenstenose	23 (30,7 %)	52 (69,3 %)	0,127*
Simvastatin	69 (36,9 %)	118 (63,1 %)	0,595*
Bisoprolol	49 (41,5 %)	69 (58,5 %)	0,380*
Ramipril	39 (35,1 %)	72 (64,9 %)	0,448*
ASS	62 (41,3 %)	88 (58,7 %)	0,263*

Tabelle 6 Ergebnisse anhand des Exakten Tests nach Fischer hinsichtlich der Proliferation der Zellen und der Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv*

Die Ergebnisse anhand des exakten Tests nach Fischer zeigen in dieser Tabelle keinen Zusammenhang. Lediglich eine Tendenz ist dabei zwischen der Aortenklappenstenose und der Proliferation mit einem p-Wert von 0,127 zu erkennen. Um die Art des Zusammenhangs näher zu betrachten, wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle für das Gesamtkollektiv dokumentiert.

Einflussfaktoren	Regressionsanalyse Proliferation n = 275			
	Odds Ratio	95 % Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
Art. Hypertonie ja vs. nein*	1,23	0,68	2,23	0,494
Hyperlipidämie ja vs. nein*	1,14	0,70	1,86	0,591
Koronare DreifäÙerkrankung ja vs. nein	1,20	0,74	1,97	0,460
Diabetes mellitus ja vs. nein*	1,21	0,71	2,06	0,479
Aortenklappenstenose ja vs. nein*	1,57	0,89	2,77	0,118
Simvastatin ja vs. nein*	1,18	0,71	1,99	0,523
Bisoprolol nein vs. ja*	1,28	0,78	2,09	0,323
Ramipril ja vs. nein*	1,24	0,75	2,05	0,393
ASS nein vs. ja	1,34	0,82	2,20	0,239

*Tabelle 7 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich Proliferation der Zellen und Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv; *Referenzkategorie*

Untersucht man das Gesamtkollektiv, zeigt sich eine Tendenz hin zur statistischen Signifikanz bei dem Faktor Aortenklappenstenose ($p = 0,118$). Die Odds Ratio von 1,57 bedeutet, dass bei Vorliegen der Krankheit die Proliferation um 57 % erhöht war, im Vergleich zu den Nicht-Erkrankten. Eine statistische Signifikanz und somit ein Zusammenhang sind allerdings nicht erkennbar.

4.2.2 Proliferation der Zellen im Frauenkollektiv

Insgesamt wurden die Daten von 74 Frauen ausgewertet. Dabei zeigen 36,5 % der mesenchymalen Stammzellen in vitro keine Proliferation, gute Proliferation ist hingegen bei 63,5 % der entnommenen Zellen zu beobachten.

Einflussfaktoren	Proliferation (n = 74)		p-Wert
	Nein n = 27 (36,5 %)	Ja n = 47 (63,5 %)	
Arterielle Hypertonie	24 (38,1 %)	39 (61,9 %)	0,736*
Hyperlipidämie	11 (32,4 %)	23 (67,6 %)	0,629*
Koronare Dreifäßerkrankung	10 (33,3 %)	20 (66,7 %)	0,806*
Aortenklappenstenose	7 (25,9 %)	20 (74,1 %)	0,211*
Simvastatin	15 (32,6 %)	31 (67,4 %)	0,458*
Bisoprolol	15 (38,5 %)	24 (61,5 %)	0,801*
Ramipril	9 (26,5 %)	25 (73,5 %)	0,146*
ASS	15 (51,7 %)	14 (48,3 %)	0,047*

Tabelle 8 Ergebnisse anhand des Exakten Tests nach Fischer hinsichtlich der Proliferation der Zellen und der Einflussfaktoren im Frauenkollektiv*

Auch hier sind die Ergebnisse, die mithilfe des Exakten Tests nach Fischer ermittelt wurden, dargestellt. Dadurch wird geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Proliferation der MSC, der Vorerkrankung und der eingenommenen Medikamente bei den weiblichen Patienten vorliegt. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der Proliferation durch das Medikament ASS. Der p-Wert liegt bei einem Wert von $p=0,047$. Somit kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen ASS und der Proliferation der MSC besteht. Betrachtet man die Patienten, die ASS eingenommen haben, im Zusammenhang in der dazu festgestellten Proliferation, so zeigt sich bei 51,7 % keine Proliferation und bei 48,3 % eine gute Proliferation. Bei den Patienten, die kein ASS eingenommen haben, zeigt sich hingegen ein wesentlich höherer Anteil an Patienten mit einer guten Proliferation (73,3 %). Diese Verteilung wird durch den exakten Test nach Fischer als signifikant eingestuft. Bei Nichteinnahme von ASS zeigte sich somit ein wesentlich größerer Anteil von MSC mit einer guten Proliferation. Bei dem Medikament Ramipril ist lediglich eine Tendenz zum Zusammenhang der beiden Parameter mit einem p-Wert von 0,146 festzustellen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der binär logistischen Regressionsanalyse wieder hinsichtlich der Proliferation und ihrer Einflussfaktoren im Frauenkollektiv zur genaueren Betrachtung der Art des Zusammenhangs in einer Tabelle dargestellt.

Einflussfaktoren	Regressionsanalyse Proliferation n = 74			
	Odds Ratio	95 % Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
Art. Hypertonie nein vs. ja*	1,64	0,40	6,80	0,494
Hyperlipidämie ja vs. nein*	1,39	0,54	3,63	0,496
Koronare Dreifäßerkrankung ja vs. nein*	1,26	0,48	3,33	0,642
Aortenklappenstenose ja vs. nein*	2,12	0,75	5,97	0,156
Simvastatin ja vs. nein*	1,55	0,59	4,09	0,376
Bisoprolol nein vs. ja*	1,20	0,46	3,10	0,710
Ramipril ja vs. nein*	2,27	0,85	6,08	0,102
ASS nein vs. ja*	2,95	1,10	7,88	0,031

*Tabelle 9 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich Proliferation der Zellen und Einflussfaktoren im Frauenkollektiv; *Referenzkategorie*

Auch hier ist eine statistische Signifikanz und somit ein Zusammenhang bei dem Medikament ASS und der Proliferation berechnet wurden. Der p – Wert beträgt $p = 0,031$. Durch die binär logistische Regressionsanalyse ist es nun möglich, eine genauere Beschreibung des Zusammenhangs zu erfassen. Bei Nichteinnahme des Medikaments ASS war die Chance für ein gutes Wachstum der mesenchymalen Stammzellen um das 2,95-fache erhöht. Dieser Wert ist allerdings nur ein Schätzwert für die hier vorliegende Stichprobe von 74 Patientinnen. Das dazugehörige Konfidenzintervall überdeckt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zusätzlich die Odds Ratio, die auf die Grundgesamtheit angewendet werden kann und somit verallgemeinerbar ist. Die wahre Odds Ratio befindet sich zwischen 1,10 und 7,88. Auch für das Medikament Ramipril ergibt sich mit einem p – Wert von 0,102 wieder ein Trend zur statistische Signifikanz. Der Effektkoeffizient beträgt 2,27. Es besteht im Zusammenhang der beiden Parameter ein Trend dahingehend, dass bei Einnahme des Medikaments Ramipril die Proliferation um das 2,27-fache erhöht war.

4.2.3 Proliferation der Zellen im Männerkollektiv

Auch bei den Männern zeigt sich bei einem Gesamtkollektiv von 201 Patienten bei der Mehrheit (61,2 %) der entnommenen Zellen ein gutes Wachstum. Bei 38,8 % ist keine Proliferation zu beobachten.

Einflussfaktoren	Proliferation (n = 201)		p-Wert
	Nein n = 78 (38,8 %)	Ja n = 123 (61,2 %)	
Arterielle Hypertonie	57 (36,8 %)	98 (63,2 %)	0,304*
Hyperlipidämie	38 (38,0 %)	62 (62,0 %)	0,885*
Koronare Dreifäßerkrankung	47 (37,0 %)	80 (63,0 %)	0,549*
Diabetes mellitus	21 (32,8 %)	43 (67,2 %)	0,279*
Simvastatin	54 (38,3 %)	87 (61,7 %)	0,875*
Bisoprolol	34 (43,0 %)	45 (57,0 %)	0,374*
Ramipril	30 (39,0 %)	47 (61,0 %)	1,000*
ASS	47 (38,8 %)	74 (61,2 %)	1,000*

Tabelle 10 Ergebnisse anhand des Exakten Tests nach Fischer hinsichtlich Proliferation der Zellen und der Einflussfaktoren im Männerkollektiv*

Analog ist auch bei den Patienten des Männerkollektivs die Proliferation der MSC in Zusammenhang mit Vorerkrankungen und Medikamenten untersucht wurden. Die Ergebnisse des Exakten Tests nach Fischer zeigen in diesem Fall keine statistische Signifikanz. Der p - Wert von 1,0 zeigt, dass ASS im Männerkollektiv im Gegensatz zu dem Frauenkollektiv in keinem signifikanten Zusammenhang mit der Proliferation steht.

Einflussfaktoren	Regressionsanalyse Proliferation n = 201			
	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
Art. Hypertonie ja vs. nein*	1,44	0,74	2,81	0,279
Hyperlipidämie ja vs. nein*	1,07	0,61	1,89	0,816
Koronare Dreifäßerkrankung ja vs. nein*	1,23	0,68	2,20	0,493
Diabetes mellitus ja vs. nein*	1,43	0,77	2,67	0,258
Simvastatin ja vs. nein*	1,07	0,58	1,99	0,821
Bisoprolol nein vs. ja*	1,34	0,75	2,39	0,322
Ramipril nein vs. ja*	1,01	0,56	1,81	0,972
ASS nein vs. ja	1,00	0,56	1,79	0,989

*Tabelle 11 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich Proliferation der Zellen und Einflussfaktoren im Männerkollektiv; *Referenzkategorie*

Im Männerkollektiv sind keine Werte mit statistischer Signifikanz erkennbar. Das Einnehmen des Medikaments ASS hat im Gegensatz zu den Frauen keinen Einfluss auf das Wachstum der mesenchymalen Stammzellen. Auch bei Ramipril und der Aortenklappenstenose sind keine Zusammenhänge feststellbar.

4.3 Zusammenhang zwischen der spontanen Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Zellen in vitro und der Krankheiten sowie Medikation

Neben der Proliferation der Zellen in vitro ist auch die spontane Aktivität der alkalischen Phosphatase hinsichtlich ihrer Einflussfaktoren statistisch auf Signifikanz untersucht wurden. Die spontane ALP-Aktivität ist in drei Stufen eingeteilt: keine, mäßige und starke Aktivität. Auch hier erfolgt die Betrachtung des Gesamtkollektiv als auch in Aufteilung nach Geschlechtern.

4.3.1 Spontane ALP- Aktivität der Zellen im Gesamtkollektiv

Im Gesamtkollektiv war bei den meisten Zellen keine Aktivität feststellbar (71,6 %). Eine mäßige Aktivität zeigten 20 % der Zellen und eine starke Aktivität nur 8,4 % der Zellen.

Einflussfaktoren	Spontane ALP-Aktivität n = 275			p-Wert
	Keine n = 197 (71,6 %)	Mäßig n = 55 (20,0 %)	Stark n = 23 (8,36 %)	
Arterielle Hypertonie	161 (73,9 %)	41 (18,8 %)	16 (7,34 %)	0,248*
Hyperlipidämie	94 (70,1 %)	26 (19,4 %)	14 (10,4 %)	0,476*
Koronare Dreifäßerkrankung	117 (74,5 %)	29 (18,5 %)	11 (7,01 %)	0,436*
Diabetes mellitus	57 (66,3 %)	18 (20,9 %)	11 (12,8 %)	0,181*
Aortenklappenstenose	51 (68,0 %)	16 (21,3 %)	8 (10,7 %)	0,626*
Simvastatin	135 (72,2 %)	38 (20,3 %)	14 (7,49 %)	0,744*
Bisoprolol	88 (74,6 %)	20 (16,9 %)	10 (8,47 %)	0,545*
Ramipril	81 (73,0 %)	20 (18,0 %)	10 (9,01 %)	0,777*
ASS	116 (77,3 %)	25 (16,7 %)	8 (6,00 %)	0,063*

Tabelle 12 Ergebnisse anhand des Chi-Quadrat Tests* hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv

Bei den Ergebnissen ist auch hier wieder das Medikament ASS auffällig. Mit einem p-Wert von 0,063 ist ein Trend erkennbar, dass zwischen den beiden Parameter ALP-Aktivität und Einnahme des Medikaments ASS ein Zusammenhang besteht. Bei Einnahme des Medikaments zeigen 77,3 % keine Aktivität, eine mäßige 16,4 % und eine starke 6,0 %. Diese Verteilung unterscheidet sich zu den Patienten, die kein ASS eingenommen haben. Der Anteil an Zellen mit keiner Aktivität liegt mit 64,8 % deutlich niedriger. Die beiden anderen Stufen hingegen zeigen einen Zuwachs. Eine mäßige Aktivität konnte bei 24 % festgestellt werden und eine starke Aktivität bei 11,2 %. Dieser Zusammenhang kann mithilfe der folgenden binären

Regressionsanalyse genauer beschrieben werden. Zur Auswertung wurde hier die ALP-Aktivität in vorhanden und nicht vorhanden eingeteilt, somit sind die Patienten mit mäßiger und starker Aktivität zusammengefasst wurden.

Einflussfaktoren	Regressionsanalyse spontane ALP-Aktivität n = 275			
	Odds Ratio	95 % Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
Art. Hypertonie nein vs. ja*	1,65	0,89	3,05	0,113
Hyperlipidämie ja vs. nein*	1,15	0,68	1,95	0,594
Koronare Dreifäßerkrankung nein vs. ja*	1,39	0,82	2,35	0,222
Diabetes mellitus ja vs. nein*	1,44	0,83	2,51	0,194
Aortenklappenstenose ja vs. nein*	1,27	0,72	2,27	0,413
Simvastatin nein vs. ja*	1,09	0,62	1,90	0,766
Bisoprolol nein vs. ja*	1,29	0,76	2,21	0,349
Ramipril nein vs. ja*	1,12	0,65	1,91	0,686
ASS nein vs. ja*	1,85	1,09	3,15	0,022

*Table 13 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv; *Referenzkategorie*

Auch hier zeigt sich im Gesamtkollektiv das Medikament ASS im Zusammenhang mit der ALP-Aktivität auffällig. Es ergibt sich ein p-Wert von 0,022 und ein Effektkoeffizient von 1,85. Somit war bei Nichteinnahme des Medikaments die Chance eine ALP-Aktivität zu messen um 85 % erhöht. Dieser Wert ist auch hier nur ein Schätzwert für unsere Stichprobe an Patienten. Die Odds Ratio, die auf die Grundgesamtheit verallgemeinerbar ist, liegt im Konfidenzintervall zwischen 1,09 und 3,15.

4.3.2 Spontane ALP-Aktivität der Zellen im Frauenkollektiv

Die meisten Zellen unter dem Frauenkollektiv (n = 74) zeigen keine ALP-Aktivität (71,6 %), mäßig war die Aktivität bei 18,9 % und stark nur bei 9,5 % der Zellen.

Einflussfaktoren	Spontane ALP-Aktivität n = 74			p-Wert
	Keine n = 53 (71,6 %)	Mäßig n = 14 (18,9 %)	Stark n = 7 (9,45 %)	
Arterielle Hypertonie	48 (76,2 %)	10 (15,9 %)	5 (7,94 %)	0,113*
Hyperlipidämie	22 (64,7 %)	7 (20,6 %)	5 (14,7 %)	0,310*
Koronare Dreigeßerkrankung	24 (80,0 %)	4 (13,3 %)	2 (6,67 %)	0,418*
Aortenklappenstenose	19 (70,4 %)	6 (17,6 %)	2 (7,41 %)	0,801*
Simvastatin	33 (71,7 %)	9 (19,6 %)	4 (8,70 %)	0,950*
Bisoprolol	28 (71,8 %)	7 (17,9 %)	4 (10,3 %)	0,953*
Ramipril	24 (70,6 %)	6 (17,6 %)	4 (11,8 %)	0,812*
ASS	22 (75,9 %)	5 (17,2 %)	2 (6,9 %)	0,770*

Tabelle 14 Ergebnisse anhand des Chi-Quadrat Tests hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Frauenkollektiv*

Die p-Werte zeigen alle eine Abweichung zur statistischen Signifikanz. Lediglich eine Tendenz kann bei der arteriellen Hypertonie mit einem p-Wert von 0,113 erkannt werden.

Einflussfaktoren

Regressionsanalyse spontane ALP-Aktivität n = 74

	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
Art. Hypertonie nein vs. ja*	3,84	1,03	14,39	0,046
Hyperlipidämie ja vs. nein*	1,88	0,68	5,22	0,227
Koronare Dreifäßerkrankung nein vs. ja*	2,07	0,70	6,16	0,191
Aortenklappenstenose ja vs. nein*	1,10	0,39	3,13	0,856
Simvastatin nein vs. ja*	1,02	0,36	2,88	0,977
Bisoprolol nein vs. ja*	1,02	0,37	2,80	0,972
Ramipril ja vs. nein*	1,10	0,40	3,03	0,856
ASS nein vs. ja*	1,42	0,49	4,09	0,517

*Tabelle 15 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Frauenkollektiv; *Referenzkategorie*

Auch in der Regressionsanalyse ist der Faktor arterielle Hypertonie auffällig und zeigt hier sogar mit einem p-Wert von 0,047 eine statistische Signifikanz und somit einen Zusammenhang mit der ALP-Aktivität im Frauenkollektiv. Die Chance für das Vorhandensein der ALP-Aktivität war bei normalen Blutdruckwerten um das 3,84fache erhöht. Dieser Zusammenhang zeigte sich nur im Frauenkollektiv und ist verallgemeinerbar. Die wahre Odds Ratio liegt in diesem Fall zwischen 1,03 und 14,39.

4.3.3 Spontane ALP-Aktivität der Zellen im Männerkollektiv

Auch im Männerkollektiv (n=201) zeigen die meisten Zellen keine spontane Aktivität hinsichtlich der ALP (71,6 %). Eine mäßige Aktivität zeigen 20,4 % der Zellen, stark war die Aktivität nur bei 8 %.

Einflussfaktoren	Spontane ALP-Aktivität n = 201			p-Wert
	Keine n = 144 (71,6 %)	Mäßig n = 41 (20,4 %)	Stark n = 16 (7,96 %)	
Arterielle Hypertonie	113 (72,9 %)	31 (20,0 %)	11 (7,10 %)	0,658*
Hyperlipidämie	72 (72,0 %)	19 (19,0 %)	9 (9,00 %)	0,793*
Koronare Dreigefäßerkrankung	93 (73,2 %)	25 (19,7 %)	9 (7,09 %)	0,764*
Diabetes mellitus	44 (68,8 %)	14 (21,9 %)	6 (9,38 %)	0,815*
Simvastatin	102 (72,3 %)	29 (20,6 %)	10 (7,09 %)	0,784*
Bisoprolol	60 (75,9 %)	13 (16,5 %)	6 (7,59 %)	0,509*
Ramipril	57 (74,0 %)	14 (18,2 %)	6 (7,79 %)	0,932*
ASS	94 (77,7 %)	20 (16,5 %)	7 (5,79 %)	0,061*

Tabelle 16 Ergebnisse anhand des Chi-Quadrat Tests hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Männerkollektiv

Auch bei den männlichen Patienten wurden mithilfe des Chi-Quadrat Testes die gesammelten Einflussfaktoren mit der spontanen ALP-Aktivität in Zusammenhang gebracht. Eine statistische Signifikanz ist auch hier nicht feststellbar. Eine Tendenz in Richtung des p-Wertes von $p < 0,05$ ist allerdings auch hier bei dem Medikament ASS mit einem p-Wert von $p=0,061$ zu sehen. Alle anderen Vorerkrankungen und Medikamente zeigten deutlich größere p-Werte.

Einflussfaktoren

Regressionsanalyse spontane ALP-Aktivität n = 201

	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
Art. Hypertonie nein vs. ja*	1,30	0,64	2,65	0,467
Hyperlipidämie nein vs. ja*	1,04	0,56	1,91	0,911
Koronare Dreifäßerkrankung nein vs. ja*	1,23	0,66	2,32	0,514
Diabetes mellitus ja vs. nein*	1,22	0,64	2,33	0,555
Simvastatin nein vs. ja*	1,12	0,58	2,18	0,736
Bisoprolol nein vs. ja*	1,43	0,75	2,72	0,277
Ramipril nein vs. ja*	1,21	0,64	2,30	0,555
ASS nein vs. ja*	2,09	1,12	3,89	0,020

*Tabelle 17 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Männerkollektiv; *Referenzkategorie*

Im Männerkollektiv hat das Medikament ASS statistisch signifikanten Einfluss auf die ALP. Der p-Wert beträgt 0,020. Die Chance auf das Vorhandensein der spontanen ALP-Aktivität in den Zellen war bei Nichteinnahme des Medikaments bei einem Effektkoeffizienten von 2,09 um 109 % erhöht. Die wahre Odds Ratio für die Grundgesamtheit liegt auch hier im Konfidenzintervall zwischen 1,12 und 3,89.

5 Diskussion

Die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin gewinnt aufgrund des Proliferations- und multiplen Differenzierungspotentials der Zellen immer mehr an Bedeutung. Die fehlende Expression von HLA Klasse II Antigenen und Fas-Rezeptor an der Zelloberfläche ermöglicht aufgrund fehlender immunologischer Eigenschaften eine allogene Anwendung ohne Abstoßungsreaktion (Lyssiotis et al. 2011; Kim et al. 2015). Schon in der Einleitung wurden einige daraus resultierende und sich entwickelnde therapeutische Ansätze von mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin genannt und erläutert. Dazu gehört die Behandlung

- der Rheumatoider Arthritis (Chen und Tuan 2008)
- der Multiplen Sklerose (Bai et al. 2009)
- der Graft-versus-Host Abstoßungsreaktion (Le Blanc et al. 2004)
- und die Behandlung akuter Myokardinfarkte (Williams et al. 2013; Quevedo et al. 2009).

Darüber hinaus gibt es weitere Ansätze, in denen die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen zu therapeutischen Zwecken erprobt wird. Ein Beispiel dafür ist die Behandlung von Patienten mit Osteogenesis imperfecta. Bei dieser autosomal dominanten Erbkrankheit kommt es zu einer fehlerhaften Synthese von Kollagen Typ I, was schon in der Kindheit zu einer extremen Knochenbrüchigkeit und -deformation sowie Wachstumsstörungen führt. Erste klinische Anwendungen von MSC zeigten eine Verbesserung dieser Krankheit (Horwitz et al. 2002; Horwitz et al. 1999). Auch bei der Behandlung von Diabetes mellitus zeigt die Therapie mit MSC im Tiermodell von diabetischen Mäusen einen ausschlagenden und vielversprechenden Erfolg. Zum einen verbesserten sich die Blutzuckerwerte der Mäuse deutlich und es konnten zum anderen in der Bauchspeicheldrüse mehr intakte Betazellen nachgewiesen werden, was zu einer vermehrten Insulinherstellung führte. Zusätzlich zeigten sich auch Reparaturprozesse in den durch die diabetische Erkrankung geschädigten Nieren der Versuchstiere (Ezquer et al. 2008; Lee et al. 2006).

Einige dieser zuvor beschriebenen Behandlungsmethoden mit MSC finden schon heute Anwendung im klinischen Alltag, andere sind noch weitgehend unerforscht und in der Entwicklung. Im Zusammenhang mit der klinischen Anwendung mesenchymaler Stammzellen in der regenerativen Medizin erscheint es wichtig, Einflussfaktoren auf die Eigenschaften der MSC zu erkennen und die therapeutischen Konsequenzen zu beachten. In dieser Arbeit erfolgt dies statistisch anhand der eingenommenen Medikamente sowie vorliegenden Erkrankungen

der Patienten. Dabei zeigten die Medikamente in einigen Fällen Einfluss auf die Proliferation sowie der ALP-Aktivität der MSC. Im Folgenden wird dies genauer diskutiert.

Statistisch signifikante Zusammenhänge zeigten sich in der Betrachtung von ASS und dessen Einfluss auf die Proliferation, sowie der spontanen ALP-Aktivität. Bei der Aufteilung nach Geschlechtern erwies sich im Frauenkollektiv die Einnahme von ASS als hemmender Faktor für die Proliferation. Bei Nichteinnahme von ASS war die Chance für eine gute Proliferation *in vitro* in den Zellen des Frauenkollektivs um das 2,95-fache erhöht. Allerdings konnte dies im Männerkollektiv nicht bestätigt werden.

Diese Daten am Patienten korrelieren mit tierexperimentellen Studien, in denen eine Hemmung der Proliferation von MSC durch ASS nachgewiesen wurde. In einem tierexperimentellen Versuch von Wang et al. (2006) wurde Knochenmark aus den Tibia- und Femurknochen von Ratten entnommen und *in vitro* mit ASS behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch ASS-Behandlung der Anteil des phosphorylierten β -Catenin im Zytosol der MSC *in vitro* signifikant anstieg und die Proliferation der Zellen durch vermehrten Abbau von β -Catenin gehemmt wurde. Je höher die Konzentration und die Inkubationszeit, desto höher auch der Anteil an phosphoryliertem β -Catenin und die vermehrte Wachstumsinhibition. Da die Proliferation in der Initialphase von MSC Transplantationen von entscheidender Bedeutung ist, wurde in dieser Studie geschlussfolgert, dass vor allem in dieser Phase eine gleichzeitige Behandlung mit ASS vermieden werden sollte. Allerdings könnte man in der Spätphase einen positiven Effekt hinsichtlich der Prävention von Neoplasien und Entartungen durch ASS Behandlung erhoffen (Wang et al. 2006). In der Literatur gibt es weitere Hinweise, dass ASS die Proliferation verschiedener Zellarten, einschließlich von MSC hemmt. Zellen der glatten Muskulatur zeigten eine Einschränkung des Wachstums durch ASS, was bei Patienten mit perkutaner transluminaler Angioplastie (PTCA) oder auch bei der postoperativen Behandlung nach koronar arteriellen Bypass zur Verhinderung eines neuen Verschlusses eine Indikation von ASS darstellen könnte (Bernhardt et al. 1993). ASS wird auch im Zusammenhang mit einer verspäteten Heilung von peptischen Ulcera diskutiert. Eine Erklärung könnte eine hemmenden Wirkung der Proliferation von Endothelzellen und die somit verminderte Angiogenese im Bereich des peptischen Ulcus sein (Pearce et al. 2003). Ein hemmender Einfluss von ASS auf die Zellproliferation hat vor allem bei Krebszellen eine präventive und therapeutische Bedeutung. Dieser Einfluss zeigte sich z.B. beim Endometrium-Ca (Gao et al. 2004) und beim kolorektalen Karzinom (Smalley und DuBois 1997; Stockbrugger 1999). Bei Zellen des kolorektalen Karzinom wurde darüber hinaus gezeigt, dass ASS auch Apoptose induziert. Als

Zielenzym von ASS wurde die NF κ B-Kinase identifiziert, wodurch die Apoptose in Krebszellen eingeleitet wird (Stark et al. 2001). Auch bei MSC konnte gezeigt werden, dass ASS Apoptose induzieren kann (Deng et al., 2009). In einem Tierexperiment, bei dem Knochenmark aus den Tibia- und Femurknochen von Ratten entnommen wurde, wurden die MSC mit ASS behandelt und 12h inkubiert. Ab einer Konzentration von 1 mM ASS zeigten sich fragmentierte Nuclei und ein erhöhter Anteil an kondensiertem Chromatin. Diese Menge könnte auch bei Dauermedikation von Patienten mit chronischen Entzündungen oder bei Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen in vivo erreicht werden. Bei diesen Versuchen zeigte sich die Beteiligung des Wnt-Signalwegs, der durch ASS gehemmt wird. Dadurch zeigte sich ein Anstieg der Apoptose und Abbau der Zellen über den vermehrt aktivierten mitochondrialen Caspase-3-Signalweg. Dieser Effekt war durch Zugabe von Wnt 3a voll reversibel und die Apoptose konnte somit verhindert werden (Deng et al. 2009).

In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass eine spontane ALP- Aktivität und damit eine beginnende Differenzierung der MSC durch ASS vermindert war. Dieser Zusammenhang konnte mit der Einnahme von ASS sowohl im Gesamtkollektiv, als auch im Männerkollektiv ermittelt werden. Im exakten Test nach Fischer zeigte sich im Gesamtkollektiv mit einem p-Wert von 0,063 ein Trend in Richtung eines Zusammenhangs. Dies war auch mit einem p-Wert von 0,061 im Männerkollektiv zu erkennen. In beiden Patientenkollektiven lieferte die binäre Regressionsanalyse signifikante Ergebnisse. Betrachtet man alle Patienten, so war bei Nichteinnahme von ASS die Chance für das Vorhandensein der spontanen ALP-Aktivität um 85 % erhöht ($p = 0,022$). Bei den männlichen Patienten war die Chance um 109% erhöht ($p = 0,020$). Im Frauenkollektiv wurde kein Zusammenhang ermittelt. In der Literatur findet man bisher wenige Angaben zur spontanen ALP Aktivität von MSC.

Im Kontext mit anderen Untersuchungen zeigt unsere Studie, dass ASS Funktionen von mesenchymalen Stammzellen, wie Proliferation und Differenzierungsverhalten beeinflusst. Im Vergleich mit experimentellen Arbeiten in vitro konnten in unseren statistischen Untersuchungen nur teilweise Effekte von ASS auf MSC festgestellt werden. Dies könnte an einer zu geringen Konzentration des Medikamentes in den Patientenzellen liegen, da die Zellen nicht direkt mit dem Medikament behandelt wurden, sondern dies nur über die Einnahme des Patienten erfolgte. Dadurch ist es möglich, dass die benötigte Konzentration für einen beeinflussenden Effekt auf die MSC nicht erreicht wird und somit kein Einfluss von ASS auf die Zellen ausgeübt wird. Bei weiteren Untersuchungen in der Zukunft sollte somit auf die Menge und die Dauer der Einnahme von ASS geachtet werden. Außerdem wurde diese in vitro Wirkung nicht an den von uns untersuchten humanen MSC festgestellt, sondern in

tierexperimentellen Versuchen beobachtet. Auch dies könnte ein Faktor dafür sein, dass dieser Effekt und Einfluss nicht bei allen unseren statistischen Untersuchungen beobachtet werden konnte.

Bei den Untersuchungen zu Simvastatin und dessen Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen ergaben sich entgegen unserer Erwartungen keine signifikanten Ergebnisse hinsichtlich Proliferation und ALP-Aktivität. Die Proliferation wurde laut unseren Ergebnissen des Exakten Test nach Fischer weder im Frauenkollektiv ($p = 0,458$), im Männerkollektiv ($p = 0,875$) noch im Gesamtkollektiv ($p = 0,595$) durch das Medikament beeinflusst. Auch in der binären Regressionsanalyse zeigten sich keine statistisch signifikanten p -Werte. Bei den Berechnungen des Exakten Tests nach Fischer hinsichtlich der ALP-Aktivität konnte kein Einfluss und Zusammenhang im Gesamtkollektiv ($p = 0,744$), im Frauenkollektiv ($p = 0,950$) oder im Männerkollektiv ($p = 0,784$) durch die Einnahme von Simvastatin beobachtet werden. Auch die durchgeführte binäre Regressionsanalyse erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang. Somit wurde unsere Hypothese, dass eine Beeinflussung durch Simvastatin besteht, widerlegt und konnte nicht bestätigt werden. Verschiedene experimentelle Versuche zeigten hingegen einen anabolen Effekt von Simvastatin auf den Knochenstoffwechsel und eine Stimulation der Knochenformation. Bei einem Versuch an Nagetieren zeigte sich nach der Applikation von Simvastatin sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* ein erhöhtes Knochenvolumen und eine erhöhte Knochenformation (Mundy et al. 1999). In einer Studie von Chen et al. induzierte Simvastatin in Osteoblasten ähnlichen Zellen schon in geringer Dosierung die Differenzierung von Osteoblasten und erhöhte die Mineralisation. Nach Applikation des Medikamentes zeigte sich eine erhöhte Expression von BMP-2 mRNA, ein Vertreter der knochenmorphogenetischen Proteine, und ein erhöhter Anteil an ALP mRNA und somit auch eine vermehrte Bildung von ALP. Dieser Mechanismus erfolgt über den Ras/Smad/Erk/BMP-2 Signalweg (Chen et al. 2010). Dieses Resultat zeigte, dass die vermehrte Expression von BMP-2 durch Simvastatin ein Trigger zur Differenzierung von Osteoblasten darstellt. Zusätzlich wurde die Expression von ALP erhöht, welches ein wichtiges Enzym für die Mineralisation von Osteoblasten ist (Maeda et al. 2001). Statine fördern somit die Lebensfähigkeit von Osteoblasten und stimulieren deren Differenzierung (Chen et al. 2010). Eine weitere Studie untersuchte *ex vivo* die Wirkung von Simvastatin auf die Proliferation und Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. Dabei zeigte sich auch hier wie erwartet ein positiver anaboler Einfluss von Simvastatin auf die osteogene Differenzierung der Zellen. Der HMG-CoA-Reductase Hemmer Simvastatin erhöhte zum einen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, einem frühen Marker der osteogenen Differenzierung und zum

anderen auch die Aktivität des Osteocalcin, einen späten Marker der Differenzierung. Weiterhin zeigte sich allerdings auch eine Verkleinerung der Zellkolonie und in späteren Stadien eine verminderte Zellanzahl in den mit Simvastatin behandelten Kulturen. Somit fördert Simvastatin zwar die Differenzierung und Mineralisation von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen, zeigte hier allerdings auch einen inhibierenden Effekt hinsichtlich Proliferation (Baek et al. 2005). Beide Effekte konnten in unseren statistisch durchgeführten Analysen nicht bestätigt werden. In allen Patientenkollektiven zeigte sich keine signifikante Wirkung von Simvastatin auf die Proliferation oder ALP-Aktivität der MSC. Dies könnte darauf hindeuten, dass die eingenommenen Dosen bei den Patienten zu gering sind, um die beobachteten Wirkungen auf Zellen in vitro auch in vivo nachzuweisen.

Auch bei den weiteren untersuchten Medikamenten, dem ACE-Hemmer Ramipril und dem β -Blocker Bisoprolol, konnten keine signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigten sowohl im Gesamtkollektiv, als auch im Frauenkollektiv und im Männerkollektiv keinen Zusammenhang zwischen der Einnahme der Medikamente und der Proliferation sowie der spontanen ALP-Aktivität der MSC. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend. Auch in der Literatur konnten wir aktuell keine Hinweise darauf finden, dass ein Einfluss dieser Medikamente auf MSC besteht.

Die hier untersuchten Erkrankungen der Patienten zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation und ALP-Aktivität der MSC. Auch in der Literatur konnten wir keine Hinweise auf eine Beeinflussung dahingehend finden.

6 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen gewinnen in der Anwendung zur Behandlung verschiedener Erkrankungen immer mehr an Bedeutung. Auch in ihrer natürlichen Funktion im menschlichen Körper stehen sie im Falle von Trauma, Krankheit oder Alter für Regenerationsprozesse zur Verfügung. Das größte Vorkommen von MSC befindet sich im menschlichen Organismus im Knochenmark in der sogenannten Stammzellnische. Dort wird die ständige Selbsterneuerung der MSC gewährleistet. Als Zellen mit einem multipotenten Differenzierungspotenzial sind MSC dazu in der Lage verschiedene Zellen des Bindegewebes zu bilden. Dazu gehören Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten. Die klinische Anwendung der MSC umfasst eine Vielzahl an verschiedenen Erkrankungen. Dies beinhaltet u.a. die Behandlung Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und Osteogenesis imperfecta. Für diese Anwendungen ist es wichtig, Einflussfaktoren auf MSC zu erkennen und die daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen zu beachten. Dazu wurden in dieser Arbeit zum einen Eigenschaften der MSC hinsichtlich Proliferation und spontaner ALP-Aktivität aus Laboraufzeichnungen ermittelt und diese in Zusammenhang mit der Medikation und Vorerkrankungen der insgesamt 275 Knochenmarkspendern aus der Herzchirurgie des Universitätsklinikum Rostock gesetzt. Zusätzlich worden die Daten zu Alter, OP-Indikation, Mehrfachmedikation und Geschlecht aufgeführt. Aufgrund einer Vielzahl an Medikamenten und Vorerkrankungen beschränkten wir uns auf die am häufigsten vertretenen. Bei den Medikamenten handelt es sich um Simvastatin, ASS, Ramipril und Bisoprolol. Die untersuchten Vorerkrankungen umfassen die arterielle Hypertonie, die koronare Dreifäßerkrankung, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus Typ II. Statistisch signifikante Zusammenhänge zeigten sich in der Betrachtung von ASS und dessen Einfluss auf die Proliferation, sowie der spontanen ALP-Aktivität. Diese Zusammenhänge konnten allerdings nicht in allen Patientenkollektiven bestätigt werden. Die positiven Ergebnisse korrelieren mit Studien, bei denen in tierexperimentellen Versuchen ein hemmender Einfluss auf MSC durch ASS hinsichtlich Proliferation und spontaner ALP-Aktivität ermittelt werden konnte. Bei der Betrachtung von Simvastatin und dessen Einfluss auf MSC konnten in unseren Untersuchungen entgegen unserer Erwartungen keine Zusammenhänge festgestellt werden. In der Literatur findet man allerdings Hinweise, dass in tierexperimentellen Versuchen Simvastatin einen anabolen Effekt auf MSC vorweist und einen inhibierenden Effekt hinsichtlich der Proliferation von MSC besitzt. Alle weiteren untersuchten Medikamente und Vorerkrankungen zeigten keinen Einfluss auf die MSC. Mögliche Gründe für nicht erzielte Zusammenhänge könnten eine zu geringe Konzentration der Medikamente ASS und Simvastatin in den Patientenzellen darstellen.

7 Thesen

1. Das Knochenmark von sowohl männlichen als auch weiblichen Spendern im Altersbereich von 37 bis 85 Jahren ist geeignet, um mesenchymale Stammzellen mit charakteristischen Stammzeleigenschaften, wie Undifferenziertheit und Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu gewinnen.
2. Patienten mit bestimmten Vorerkrankungen, wie in unseren Untersuchungen bei den Frauen am häufigsten mit arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie, koronarer Dreifäßerkrankung und Aortenklappenstenose, sowie bei den Männern zusätzlich mit Diabetes mellitus Typ II sind gleichermaßen als Stammzellspender geeignet. Diese Vorerkrankungen haben keinen augenscheinlichen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Knochenmarkstammzellen.
3. Die Knochenmarkspender dieses Altersbereiches und mit den zuvor genannten Vorerkrankungen erhalten am häufigsten die Medikamente ASS, Simvastatin, Bisoprolol und Ramipril.
4. Die Medikation mit ASS kann die Proliferation von MSC hemmen, was vor allem bei Frauen als Spender zu beachten ist.
5. ASS als Medikation hat auch einen hemmenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung von MSC des Spenders, was vor allem bei Männern der Fall zu sein scheint.
6. Die medikamentöse Behandlung mit Simvastatin sollte bei der Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark ebenfalls Beachtung geschenkt werden. *In vitro* Experimente an Tiermodellen haben gezeigt, dass Simvastatin die osteogene Differenzierung von MSC fördert, aber die Proliferation hemmt. Allerdings kann ein *in vivo* Effekt in unserer Arbeit bei den Patienten nicht festgestellt werden.
7. Insgesamt sind Vorerkrankungen der Stammzellspender nicht kritisch für die funktionellen Eigenschaften der Knochenmarkstammzellen. Bei der Medikation sind allerdings Effekte von ASS und möglicherweise von Simvastatin zu beachten.
8. Bei einem therapeutischen Einsatz von Stammzellen aus dem Knochenmark sind diese Effekte durch Medikation in Hinblick auf das Differenzierungspotential, sowie Zahl der einzusetzenden Zellen aufgrund unterschiedlichen Proliferationsverhaltens zu bedenken.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ALP	Alkalischen Phosphatase
AS	Aortenklappenstenose
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Angiotensin
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFU	Colony forming units
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	European Society of Cardiology
ESH	European Society of Hypertension
FCS	Fetal Calf Serum
HDL	High Density Lipoprotein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLP	Hyperlipoproteinämie
HMG – CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
KDG	Koronare Dreifäßerkrankung
LDL	Low Density Lipoprotein
MgATP	Magnesium – Adenosintriphosphat
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
PTCA	perkutane transluminaler Angioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCA	Arteria coronaria dextra
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
Saos-2	Sarcoma steogenic
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Durch β_1 - und β_2 - Rezeptoren vermittelte Wirkungen (modifiziert nach (Lopez-Sendon et al. 2004).....	9
Tabelle 2 Einteilung der Hypertonieschweregrade (modifiziert nach den Leitlinien 2013 der ESH/ESC (Mancia et al. 2013)	11
Tabelle 3 AHA-Einteilung von Koronarstenosen (Austen et al. 1975)	12
Tabelle 4 Klassifikation des Diabetes mellitus (modifiziert nach American Diabetes Association 1997; Alberti und Zimmet 1998; Brückel und Kerner 2006).....	14
Tabelle 5 Schweregradeinteilung der Aortenklappenstenose (Baumgartner et al. 2009)	15
Tabelle 6 Ergebnisse anhand des Exakten Tests nach Fischer* hinsichtlich der Proliferation der Zellen und der Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv	35
Tabelle 7 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich Proliferation der Zellen und Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv; *Referenzkategorie	36
Tabelle 8 Ergebnisse anhand des Exakten Tests nach Fischer* hinsichtlich der Proliferation der Zellen und der Einflussfaktoren im Frauenkollektiv.....	37
Tabelle 9 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich Proliferation der Zellen und Einflussfaktoren im Frauenkollektiv; *Referenzkategorie	38
Tabelle 10 Ergebnisse anhand des Exakten Tests nach Fischer* hinsichtlich Proliferation der Zellen und der Einflussfaktoren im Männerkollektiv	39
Tabelle 11 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich Proliferation der Zellen und Einflussfaktoren im Männerkollektiv; *Referenzkategorie	40
Tabelle 12 Ergebnisse anhand des Chi-Quadrat Tests* hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv.....	41
Tabelle 13 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Gesamtkollektiv; *Referenzkategorie	42
Tabelle 14 Ergebnisse anhand des Chi-Quadrat Tests* hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Frauenkollektiv.....	43
Tabelle 15 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Frauenkollektiv; *Referenzkategorie	44
Tabelle 16 Ergebnisse anhand des Chi-Quadrat Tests hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Männerkollektiv	45
Tabelle 17 Binäre Regressionsanalyse hinsichtlich der spontanen ALP-Aktivität und der Einflussfaktoren im Männerkollektiv; *Referenzkategorie	46

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 lichtmikroskopische Darstellung der CFU's	18
Abbildung 2 lichtmikroskopische Darstellung der ALP-Aktivitäten.....	19
Abbildung 3 Darstellung der Altersverteilung im Gesamtkollektiv	23
Abbildung 4 Darstellung der Altersverteilung im Frauenkollektiv	24
Abbildung 5 Darstellung der Altersverteilung im Männerkollektiv	25
Abbildung 6 Häufigkeitsverteilung der Vorerkrankungen im Gesamtkollektiv	26
Abbildung 7 Darstellung der Mehrfacherkrankungen im Gesamtkollektiv.....	26
Abbildung 8 Häufigkeitsverteilung der Vorerkrankungen der Frauen	27
Abbildung 9 Darstellung der Mehrfacherkrankungen der Frauen	27
Abbildung 10 Häufigkeitsdarstellung der Vorerkrankungen im Männerkollektiv	28
Abbildung 11 Darstellung der Mehrfacherkrankungen der Männer	28
Abbildung 12 Häufigkeitsverteilung der Medikamenteneinnahme im Gesamtkollektiv.....	29
Abbildung 13 Darstellung der Mehrfachmedikation im Gesamtkollektiv.....	29
Abbildung 14 Häufigkeitsverteilung der Medikamenteneinnahme im Frauenkollektiv.....	30
Abbildung 15 Darstellung der Mehrfachmedikation im Frauenkollektiv	30
Abbildung 16 Häufigkeitsverteilung der Medikamenteneinnahme im Männerkollektiv	31
Abbildung 17 Darstellung der Mehrfachmedikation im Männerkollektiv.....	31
Abbildung 18 OP-Indikationen im Gesamtkollektiv	32
Abbildung 19 OP-Indikationen im Frauenkollektiv.....	33
Abbildung 20 OP-Indikation im Männerkollektiv	34

11 Literatur

Akpunonu BE, Mulrow PJ, Hoffman EA (1996) Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis Mon* 42: 609–722.

Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539–553.

Alberts AW (1990) Lovastatin and simvastatin--inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *Cardiology* 77 Suppl 4: 14–21.

Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3957–3961.

American Diabetes Association (1997) Clinical practice recommendations. *Diabetes Care* 20 Suppl 1: S1-70.

Austen WG, Edwards JE, Frye RL, Gensini GG, Gott VL, Griffith LS, McGoon DC, Murphy ML, Roe BB (1975) A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the Ad Hoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease, Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association. *Circulation* 51: 5–40.

Awtry EH, Loscalzo J (2000) Aspirin. *Circulation* 101: 1206–1218.

Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, Han JH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK (2005) The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci* 20: 438–444.

Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH (2009) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 57: 1192–1203.

Barrios-González J, Miranda RU (2010) Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 869–883.

Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Iung B, Otto CM, Pellikka PA, Quinones M (2009) Echocardiographic assessment of valve stenosis; EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Eur J Echocardiogr* 10: 1–25.

- Bernhardt J, Rogalla K, Luscher TF, Buhler FR, Resink TJ (1993) Acetylsalicylic acid, at high concentrations, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 973–976.
- Bianco P, Robey PG (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414: 118–121.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 44: 215–230.
- Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS (2004) Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 93: 1210–1230.
- Bristow MR (1993) Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. *Am J Cardiol* 71: 12C–22.
- Bristow MR (2000) beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101: 558–569.
- Brückel J, Kerner W (2006) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus 1: 177–180.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641–650.
- Carretero OA, Oparil S (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101: 329–335.
- Chen FH, Tuan RS (2008) Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 10: 223.
- Chen P, Sun J, Tsuang Y, Chen M, Weng P, Lin F (2010) Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res* 30: 191–199.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26: 2287–2299.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204–2213.
- Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Barwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, Mugge A, Schafers HJ, Flachskampf FA (2006) Aortic stenosis. *Clin Res Cardiol* 95: 620–641.

Deng L, Hu S, Baydoun AR, Chen J, Chen X, Cong X (2009) Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Prolif* 42: 721–730.

Devine SM, Hoffman R (2000) Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 7: 358–363.

Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, Spina R, Felaco M, Barsotti A, Caterina R de (2001) Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 51: 283–293.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.

Drize NJ, Surin VL, Gan OI, Deryugina EI, Chertkov JL (1992) Gene therapy model for stromal precursor cells of hematopoietic microenvironment. *Leukemia* 6 Suppl 3: 174S–175.

European Society of Hypertension-European Society of Cardiology (2003) Guidelines for the management of arterial hypertension 21: 1011–1053.

Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yanez AJ, Conget PA (2008) Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 631–640.

Faggiano P, Antonini-Canterin F, Erlicher A, Romeo C, Cervesato E, Pavan D, Piazza R, Huang G, Nicolosi GL (2003) Progression of aortic valve sclerosis to aortic stenosis. *Am J Cardiol* 91: 99–101.

Fioretti PM, Pozzoli MM, Ilmer B, Salustri A, Cornel JH, Reijs AE, Krenning EP, Reiber JH, Feyter PJ de, Roelandt JR (1992) Exercise echocardiography versus thallium-201 SPECT for assessing patients before and after PTCA. *Eur Heart J* 13: 213–219.

Frampton JE, Peters DH (1995) Ramipril. *Drugs* 49: 440–466.

Franceschi RT, Iyer BS (1992) Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 7: 235–246.

Fredrickson DS, Lees RS (1965) A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation* 31: 321–327.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230–247.

Frishman WH (1983) Multifactorial actions of beta-adrenergic blocking drugs in ischemic heart disease: current concepts. *Circulation* 67: I11-8.

Gao J, Niwa K, Sun W, Takemura M, Lian Z, Onogi K, Seishima M, Mori H, Tamaya T (2004) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 95: 901–907.

Gerber JG, Nies AS (1985) Beta-adrenergic blocking drugs. *Annu Rev Med* 36: 145–164.

Hagmann S, Moradi B, Frank S, Dreher T, Kammerer PW, Richter W, Gotterbarm T (2013) Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet Disord* 14: 223.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8932–8937.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393–395.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5: 309–313.

Hung J (2003) Aspirin for cardiovascular disease prevention. *Med J Aust* 179: 147–152.

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J* 17: 1371–1384.

Jones DL, Wagers AJ (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 11–21.

Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J3 (1961) Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 55: 33–50.

Kaschina E, Unger T (2003) Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 12: 70–88.

Kim J, Shapiro L, Flynn A (2015) The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 151: 8–15.

Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A (2001) Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68: 235–244.

Krentz H (2005) *Schließende statistische Analysen*. Shaker, Aachen.

Kuhn NZ, Tuan RS (2010) Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 222: 268–277.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6: 1004–1010.

Lancaster SG, Sorkin EM (1988) Bisoprolol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in hypertension and angina pectoris. *Drugs* 36: 256–285.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439–1441.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17438–17443.

Lindroos M, Kupari M, Heikkila J, Tilvis R (1993) Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol* 21: 1220–1225.

Lipsky PE (1999) Role of cyclooxygenase-1 and -2 in health and disease. *Am J Orthop* 28: 8–12.

Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C (2004) Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J* 25: 1341–1362.

Lyssiotis CA, Lairson LL, Boitano AE, Wurdak H, Zhu S, Schultz PG (2011) Chemical control of stem cell fate and developmental potential. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 200–242.

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17: 9–26.

Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N (2001) Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 874–877.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103: 697–705.

Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, Backer G de, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F (2013) ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension 31: 1281–1357.

Metra M, Dei Cas L, Di Lenarda A, Poole-Wilson P (2004) Beta-blockers in heart failure: are pharmacological differences clinically important? *Heart Fail Rev* 9: 123–130.

Mohler ER3, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103: 1522–1528.

Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902–10908.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G (1999) Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286: 1946–1949.

Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium

and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 14: 840–850.

O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM (1996) Apolipoproteins B, (a), and E Accumulate in the Morphologically Early Lesion of 'Degenerative' Valvular Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 523–532.

Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA (2003) Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 139: 761–776.

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377–384.

Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS (1999) Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* 341: 142–147.

Otto CM, Pearlman AS, Gardner CL (1989) Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 13: 545–550.

Pearce HR, Kalia N, Bardhan KD, Brown NJ (2003) Effects of aspirin and indomethacin on endothelial cell proliferation in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 1180–1187.

Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, Pyorala K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H (2004) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl* 5: 81–87.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.

Pruefer D, Scalia R, Lefer AM (1999) Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2894–2900.

Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW, Hare JM (2009) Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14022–14027.

Reilly IA, FitzGerald GA (1988) Aspirin in cardiovascular disease. *Drugs* 35: 154–176.

Reiter MJ (2004) Cardiovascular drug class specificity: beta-blockers. *Prog Cardiovasc Dis* 47: 11–33.

Rentrop KP, Feit F, Sherman W, Thornton JC (1989) Serial angiographic assessment of coronary artery obstruction and collateral flow in acute myocardial infarction. Report from the second Mount Sinai-New York University Reperfusion Trial. *Circulation* 80: 1166–1175.

Roth GJ, Majerus PW (1975) The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56: 624–632.

Sanmuganathan PS, Ghahramani P, Jackson PR, Wallis EJ, Ramsay LE (2001) Aspirin for primary prevention of coronary heart disease: safety and absolute benefit related to coronary risk derived from meta-analysis of randomised trials. *Heart* 85: 265–271.

Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441: 1075–1079.

Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4: 7–25.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ (2002) Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73: 1919-25; discussion 1926.

Skowasch D, Steinmetz M, Nickenig G, Bauriedel G (2006) Is the degeneration of aortic valve bioprostheses similar to that of native aortic valves? Insights into valvular pathology. *Expert Rev Med Devices* 3: 453–462.

Smalley WE, DuBois RN (1997) Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 39: 1–20.

Smith CG, Vane JR (2003) The discovery of captopril. *FASEB J* 17: 788–789.

Smith WL (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263: F181-91.

Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S (1999) The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 13: 819–828.

Stark LA, Din FV, Zwacka RM, Dunlop MG (2001) Aspirin-induced activation of the NF-kappaB signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *FASEB J* 15: 1273–1275.

Stockbrugger RW (1999) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 8 Suppl 1: S21-5.

Stone NJ (1994) Secondary causes of hyperlipidemia. *Med Clin North Am* 78: 117–141.

Thomsen R, Rasmussen HB, Linnet K (2013) In Vitro Drug Metabolism by Human Carboxylesterase 1; Focus on Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors 42: 126–133.

Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Baron-Esquivias G, Baumgartner H, Borger MA, Carrel TP, Bonis M de, Evangelista A, Falk V, Lung B, Lancellotti P, Pierard L, Price S, Schafers H, Schuler G, Stepinska J, Swedberg K, Takkenberg J, Oppell UO von, Windecker S, Zamorano JL, Zembala M (2012) Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg* 42: S1-44.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97–120.

Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M (2002) MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 7: 113–117.

Wang Y, Chen X, Zhu W, Zhang H, Hu S, Cong X (2006) Growth inhibition of mesenchymal stem cells by aspirin: involvement of the WNT/beta-catenin signal pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 696–701.

Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC (1997) HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 30: 1212–1217.

Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, McCall F, Carvalho D, Suncion V, Morales AR, Da Silva J, Sussman MA, Heldman AW, Hare JM (2013) Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation* 127: 213–223.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2692–2696.

Zhao B, Liu Y (2014) Simvastatin induces the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Fundam Clin Pharmacol* 28: 583–592.