

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. J. Eulert**

**In vitro Herstellung eines vorderen Kreuzbandkonstruktes aus  
mesenchymalen Stammzellen und einem Kollagen Typ I-Hydrogel**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Kathrin Schupp  
aus Neuendorf**

**Würzburg, August 2006**

**Referent: Prof. Dr. med. C. Hendrich**

**Koreferent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull**

**Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2007**

**Die Promovendin ist Ärztin**

**Meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das vordere Kreuzband	1
1.1.1 Geschichte der Kreuzbandchirurgie	1
1.1.2 Anatomie und Physiologie des vorderen Kreuzbandes	3
1.1.3 Möglichkeiten des Kreuzbandersatzes heute	4
1.2 Tissue Engineering	6
1.2.1 Definition	6
1.2.2 Strategien zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes	8
1.3 Fragestellung	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Isolierung und Kultivierung humaner ACL-Fibroblasten	11
2.2 Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark	12
2.3 Herstellung des Kollagengels	13
2.4 Herstellung des Kreuzbandkonstruktes	13
2.5 Bioreaktor und zyklische Dehnungsversuche	15
2.5.1 Bioreaktor	15
2.5.2 Zyklische Dehnungsversuche	17
2.6 Histologie	17
2.6.1 Aufbereitung der Zellen und Konstrukte	17
2.6.2 Histochemische Färbungen	18
2.6.3 Immunhistochemische Färbungen	19
2.7 RT-PCR	20
2.7.1 Aufbereitung der Zellen und Konstrukte	20
2.7.2 RNA-Isolierung	21

2.7.3	cDNA-Synthese	22
2.7.4	Polymerase-Ketten-Reaktion und Gelelektrophorese	22
2.8	Chemikalien und Geräte	23
2.8.1	Chemikalien	23
2.8.2	Antikörper	25
2.8.3	Primer	25
2.8.4	Materialien und Geräte	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen und Fibroblasten	28
3.1.1	Zellmorphologie	28
3.1.2	Immunhistochemische Färbungen	29
3.1.3	RT-PCR	31
3.2	Ergebnisse der Konstruktherstellung	32
3.3	Einfluss von zyklischer Dehnung auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	33
3.3.1	Histochemische Färbungen	33
3.3.2	Immunhistochemische Färbungen	35
3.3.3	RT-PCR	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1	Wahl des Trägermaterials	39
4.2	Vergleich von ACL-Fibroblasten und MSCs aus dem Knochenmark	41
4.3	Herstellung des Kreuzbandkonstruktes	43
4.3.1	Entwurf des Bioreaktors	43
4.3.2	Verankerung durch endständige Knochenblöcke	44
4.4	Mechanische Stimulation durch zyklische Dehnung	45

4.5	Einfluss von Wachstumsfaktoren	48
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACL	Anterior Cruciate Ligament - Vorderes Kreuzband
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
cDNA	Complementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMEM/HAM'S F-12	Dulbecco`s Modified Eagels Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Foetal Bovine Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
MCL	Medial Collateral Ligament - Mediales Seitenband
MSCs	Mesenchymal Stem Cells - Mesenchymale Stammzellen
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PLA	Polylactit Acid
PGA	Polyglycosid Acid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1

# 1 Einleitung

## 1.1 Das vordere Kreuzband

Verletzungen des vorderen Kreuzbandes gehören zu den häufigsten Verletzungen des menschlichen Bandapparates. Durch das wachsende Gesundheitsbewusstsein und die zunehmende Bedeutung von Freizeit- und Leistungssport ist die Inzidenz von Kreuzbandrupturen in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen. Aktuell wird sie in den Industrienationen auf bis zu eine Ruptur pro 1000 Einwohner geschätzt (Rupp et al., 2002). Betroffen sind vor allem jüngere Menschen. Neben individuellen Problemen, wie Schmerzen, Instabilität oder sekundär degenerativen Erkrankungen des Kniegelenks, hat dies auch enorme sozioökonomische Auswirkungen. Zwar ist es in den letzten Jahren gelungen, mittels autologer Sehnentransplantate einen suffizienten Kreuzbandersatz zu erreichen, jedoch treten nicht selten Probleme an der Entnahmestelle (so genannte doner-site-morbidity) auf.

### 1.1.1 Geschichte der Kreuzbandchirurgie

Die Kreuzbänder des Kniegelenkes wurden erstmals um 3000 v. Chr. auf einer ägyptischen Papyrusrolle erwähnt. Ihren Namen „Ligamenta genu cruciata“ erhielten sie von Claudius Galen von Pergamon (199-129 v. Chr.) als Bänder zur Stabilisierung des Kniegelenkes. Es folgten weitere Beschreibungen zur Funktion und Therapie von Kreuzbandverletzungen, bis 1895 von Robson die erste Primärnaht eines Kreuzbandes mittels Catgut durchgeführt wurde (Robson, 1903). Damals wurde die Primärnaht als Therapie der Wahl bei einer akuten Ruptur empfohlen. Im Weiteren folgten vielfältige Versuche zur Rekonstruktion des Kreuzbandes mittels autologer Faszien- und Muskeltransplantate, die in Bohrkanäle eingebracht wurden. Im Laufe der Jahre entstand eine lebhafte Diskussion über die Vorzüge der operativen versus der konservativen Therapie der Kreuzbandruptur. Wenn operativ behandelt werden sollte, dann mittels primärer Bandnaht oder durch Kreuzbandrekonstruktion mit Hilfe gestielter oder freier Faszien- bzw. Sehnentransplantate. Ab Mitte der achtziger Jahre kam man wegen schlechter Langzeitergebnisse von der

Primärnaht ab (Odensten et al., 1984; Kaplan et al., 1990). Autologe Patellarsehnentransplantate mit endständigen Knochenblöcken wurden erstmals 1963 von Jones und 1966 von Brückner zur Kreuzbandrekonstruktion beschrieben (Jones et al., 1963; Brückner et al., 1966). Beide gelten deshalb als Vorreiter der heute verwendeten Knochen-Sehnen-Knochen-Transplantate. Der Ersatz des vorderen Kreuzbandes durch xenogene Sehnen, der erstmals 1930 mit Känguruhsehnen praktiziert wurde, war zwar erfolgreich, konnte sich jedoch nie durchsetzen (Bircher et al., 1930).

Ab Mitte der achtziger Jahre wurden erste Versuche mit allogenen Sehnentransplantaten beim Menschen durchgeführt. Diese hatten vielfältige Vorteile, wie z.B. fehlende Entnahmemorbidität, Schmerzreduktion, kleinere Narben und der Einsatz ausgesuchter Transplantatgrößen (Burger et al., 2000). Wegen des Risikos von Virusinfektionen ist eine Anwendung in Deutschland allerdings nur in Ausnahmefällen, wie bei komplexen Knieinstabilitäten und Revisionseingriffen indiziert (Eberhardt et al., 2002).

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden vielfältige Versuche mit natürlichen und synthetischen Bandmaterialien, wie Seide oder Problast, sowohl als alleiniger Ersatz als auch zur Augmentation von Sehnentransplantaten durchgeführt. Diese zeigten aber durchweg schlechte Ergebnisse. Wegen abnehmendem Aktivitätsniveau, hoher Rupturrate und chronischen Entzündungen werden in Deutschland derzeit nur noch selten synthetische Bandmaterialien verwendet (Wredmark et al., 1993; Klein et al., 1992; Ritchie et al., 1996).

Die Geschichte der Kreuzbandchirurgie war bestimmt von der Suche nach einem möglichst idealen Material für den Ersatz des rupturierten Bandes. Bis heute hat sich der autologe Bandersatz mittels Patellarsehnen-, Semitendinosus- oder Gracilissehnentransplantaten als bestmögliche Versorgung von Kreuzbandrupturen bewährt.

### **1.1.2 Anatomie und Physiologie des vorderen Kreuzbandes**

Das vordere Kreuzband entspringt fächerförmig an der Innenfläche des Condylus lateralis des Femur und verläuft, in fettreichem Bindegewebe eingebettet, schräg durch das Kniegelenk nach vorne distal. Es inseriert an der Area intercondylaris der Tibia (Odensten et al., 1985). Die Insertionszonen lassen sich in die Gruppe der chondral-apophysären Bandansätze am Knochen einteilen (Peterson et al., 1995). Das straffe Bindegewebe des Kreuzbandes ist durch Abschnitte nicht mineralisierten und mineralisierten Faserknorpels mit dem Knochen verbunden. Diese Insertionsart gewährleistet als Puffer einen Ausgleich der verschiedenen Elastizitätseigenschaften von Band und Knorpel und lässt eine direkte Kraftübertragung zu (Knese et al., 1958).

Durch die Bedeckung mit einer Membrana synovialis vorne und an den Seiten liegt das Kreuzband streng genommen außerhalb der Gelenkhöhle, ist aus klinischer Sicht aber als intrakapsuläres Band einzuordnen (Peterson et al., 2002).

Das vordere Kreuzband setzt sich hauptsächlich aus straffem Bindegewebe zusammen. Ein Großteil (ungefähr 75% des Trockengewichts) besteht aus Kollagen, wobei Kollagen I einen Anteil von 90% und Kollagen III einen Anteil von 10% hat (Carlstedt et al., 1989). Die Kollagenfasern sind in größere Kollagenfaszikel zusammengefasst und verlaufen parallel in Zugrichtung des Kreuzbandes (Arnoczky, 1983). Kollagen I ist vor allem für die hohe Zugfestigkeit des Bandes verantwortlich, während Kollagen III die Viskoelastizität und den Schutz der Blutgefäße bedingt (Petersen et al., 2002).

Elastin, Proteoglykane und Glykoproteine wie Fibronectin und Vimentin machen weniger als 5% des Bandgewichtes aus. Fibroblasten haben einen Anteil von etwa 20% am Trockengewicht (Hunziker, 1990).

Die Gefäßversorgung ist durch Endäste der Arteria genus media am proximalen Pol und der Arteriae genus inferiores am distalen Pol gewährleistet. Beide bilden periligamentäre Netzwerke um das Kreuzband, von denen kleine Gefäße ins Kreuzband ziehen und sich an der Verlaufsrichtung des Bandes ausrichten (Arnoczky, 1985; Peterson et al., 1996).

Die Hauptfunktion des Kreuzbandes ist die Stabilitätssicherung des Kniegelenkes in Beugestellung. Hier wird ein unphysiologisches Verschieben der Tibia gegenüber dem Femur verhindert und eine Begrenzung der Innenrotation erreicht (Butler et al., 1980; Grüber et al., 1986; Takeda et al., 1994). Durch Mechanorezeptoren an den Insertionszonen und im synovialen Bindegewebe trägt das Kreuzband zur Wahrnehmung der Kniegelenksstellung bei (Halata et al., 1989; Hungervorst et al., 1998). Über eine Rückkopplung können dadurch Tonus und Aktivität stabilisierender Muskeln, wie z.B. der ischiokruralen Muskulatur, die als Agonist des vorderen Kreuzbandes wirkt, beeinflusst werden (Grood et al., 1981).

Ein intaktes vorderes Kreuzband ist für die normale Bewegung und Kinetik des Kniegelenkes, wie aus den oben genannten Funktionen des Bandes hervorgeht, von größter Relevanz.

### **1.1.3 Möglichkeiten des Kreuzbandersatzes heute**

Das Therapiekonzept der Wahl zur Behandlung von Kreuzbandrupturen ist aufgrund des schlechten intrinsischen Heilungspotentials des Bandes (Hawkins et al., 1986; Menetrey et al., 1999; Kobayashi et al., 2000) seine chirurgische Rekonstruktion (O'Donoghue D, 1971; Dunn, 1998; Woo et al., 1997a und 1999). Mit Ausnahme von Revisionseingriffen und komplexen Knieinstabilitäten kommt heute vor allem das autologe Transplantat zum Einsatz. Noch immer gibt es eine kontroverse Diskussion bezüglich der Therapieerfolge der drei häufigsten in Deutschland verwendeten Kreuzbandtransplantate. Es stehen das mittlere Drittel der Patellarsehne, Semitendinosus- und Gracilissehne oder der zentrale Anteil der Quadrizepssehne zur Verfügung. Alle besitzen eine Reißfestigkeit, die der des intakten Kreuzbandes entspricht oder diese noch übertrifft (Stecker et al., 1999).

Die am häufigsten verwendeten Autografts sind Knochen-Patellarsehnen-Knochen-Transplantate und Semitendinosussehnen.

Die mechanischen Eigenschaften, wie z.B. Versagenslast pro Querschnittsfläche und Reißfestigkeit, sind bei Patellarsehnentransplantaten höher als bei Semitendinosussehnen oder Quadrizepssehnen (Stäubli et al., 1996; Hamner

et al., 1999). Über die Knochenblockenden ist eine sichere und schnell heilende Verankerungsmöglichkeit im Kniegelenk gegeben. Als mögliche Probleme der Patellarsehnenplastik werden in der Literatur Patellafrakturen, Sehnenrupturen, Tendinitiden, Krepitationen, Verkürzung der Sehne mit Schmerzen und Reduktion der Streckerkraft sowie das Auftreten retropatellarer Schmerzsymptomatik angegeben (Aglietti et al., 1993; Bonamo et al., 1984; McCarroll, 1983; Kartus et al., 1999; Rosenberg et al., 1990). Diese Komplikationen sind selten, aber bei Auftreten schwer zu behandeln. Patellarsehnenplastiken werden bevorzugt bei Leistungssportlern und sehr aktiven Personen verwendet (Weiler, 2002).

Semitendinosussehnen werden einfach oder als so genannte Hamstrings bis zu vierfach gebündelt verwendet. Durch die Bündelung nimmt die absolute Reißfestigkeit geringgradig ab, da nicht alle Sehnenstränge in gleicher Richtung verlaufen. Man erhält jedoch eine komplexere Kinematik des Kniegelenks, vergleichbar mit einem nativen Kreuzband (Wallace et al., 1997; Woo et al., 1997b). Bei der Transplantation von Hamstringsehnen ist die Morbiditätsgefahr relativ gering. Probleme treten selten und dann meist nur temporär auf. Über Schmerzen, Verkürzungszustände der Muskulatur und Störungen der Innenrotation wird berichtet (Yasuda et al., 1995; Viola et al., 2000). Hamstrings gelten als bester Kreuzbandersatz für durchschnittlich belastete Kniegelenke (Weiler, 2002).

Der mittlere Anteil der Quadrizepssehne stellt die dritte Ersatzmöglichkeit für das rupturierte Kreuzband dar, wird aber selten verwendet. Sie ist zwar mit einer geringeren Entnahmemorbidität verbunden als die Patellarsehne, wird aber wegen schlechterer mechanischer Eigenschaften lediglich in der Revisionschirurgie eingesetzt. Als Probleme können bei der Quadrizepssehnentransplantation Schmerzen, Funktionseinschränkungen und Abnahme der Quadrizepskraft auftreten (Chen et al., 1999; Comley et al., 1999).

Obwohl sich die Ergebnisse der Kreuzbandchirurgie in den letzten Jahren deutlich verbessert haben, bleibt die Herausforderung, einen einfach und schnell zu implantierenden, künstlichen Kreuzbandersatz zu entwickeln.

## **1.2 Tissue Engineering**

Gewebe und Organschäden durch Unfälle oder Krankheiten bedeuten häufig eine schwerwiegende Einschränkung der Gesundheit und einen hohen Kostenfaktor im Gesundheitswesen. Für viele dieser Verletzungen und Erkrankungen gibt es bis heute keine adäquaten Behandlungsmöglichkeiten um eine Restitutio ad Integrum zu erreichen. Das relativ neue Gebiet des Tissue Engineering bietet ein großes therapeutisches Potential für den Ersatz oder die Regeneration von defektem oder erkranktem Gewebe des muskuloskeletalen Systems (Marler et al., 1998; Laurencin et al., 1999; Huard et al., 2003).

### **1.2.1 Definition**

Tissue Engineering ist ein Ende der achziger Jahre erstelltes und von Langer und Vacanti (1993) erstmals beschriebenes, interdisziplinäres Forschungskonzept, das die Prinzipien und Methoden der Ingenieurwissenschaften und der Lebenswissenschaften dahingehend vereint, Möglichkeiten zu finden, die Funktion verschiedenster Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern.

Schon 1933 gab es erste Ansätze zu diesem Konzept, als bei Versuchen Tumorzellen von Mäusen auf einer Polymermembran in die Bauchhöhle von Schweinen eingebracht wurden (Bisceglie, 1933). Anfang der achtziger Jahre wurden erfolgreich Forschungen zur Herstellung von Hauttransplantaten aus Zellen auf 2D-Kollagenkonstrukten durchgeführt (Bell et al., 1981; Burke et al., 1981). Im Laufe der Jahre wurde das Tissue Engineering durch zahlreiche Experimente mit verschiedensten Geweben weiterentwickelt. Heute gibt es weltweit Forschungsaktivitäten, die sich mit Tissue Engineering aller Gewebe des menschlichen Körpers beschäftigen (Fuchs et al., 2001; Nöth et al., 2003).

Tissue Engineering setzt sich aus drei Prinzipien der Geweberekonstruktion zusammen:

1. Einsatz von Trägermaterialien (Scaffolds)
2. Einsatz von Zellen, die das zu regenerierende Gewebe ersetzen sollen
3. Einsatz von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren oder anderer (z.B. mechanischer) Stimuli (Langer et al., 1993; Vacanti et al., 1999)

Ein neuer erfolgversprechender Ansatz ist die Verwendung von autologen mesenchymalen Stammzellen. Diese Zellen können aus unterschiedlichen Geweben gewonnen werden (Nöth et al., 2002b; Tuan et al., 2003), wie z.B. aus Knochenmark (Caplan et al., 1991; Nöth et al., 2002a). Als multipotente Zellen haben sie die Fähigkeit, in eine Vielzahl von Geweben mesenchymalen Ursprungs, wie Knochen, Knorpel, Bänder, Sehnen, Muskel und Fett zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Nach Woo et al. (1999) können MSCs in die meisten Zellen differenzieren, die für die Produktion von Substanzen, wie Kollagen, Proteoglykane, Zytokine und Gewebsenzyme, verantwortlich sind. Außerdem deuten neuere Untersuchungen am Tiermodell darauf hin, dass MSCs bei allogener Transplantation nicht als Fremdgewebe erkannt werden und deshalb keine Abstoßungsreaktion auslösen (Caplan et al., 2001).

Als Trägermaterialien können organische oder synthetische Stoffe verwendet werden. Organische Materialien, wie Kollagen, Fibrin oder Alginat, haben den Vorteil, Strukturen im Körper gut zu imitieren und auch in ähnlicher Weise wie diese zu reagieren. Synthetische Materialien, wie z.B. Polylaktat oder Polyglykosid, sind dagegen einfacher zu kontrollieren und können besser in ihrer Festigkeit, Degradierungseigenschaft und Mikro- bzw. Makrostruktur verändert und angepasst werden (Vacanti et al., 1999). Unabhängig vom verwendeten Material sollte das Scaffold eine flexible, poröse Struktur besitzen, um den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zu den Zellen und damit ein Wachstum des neuen Gewebes in den Poren zu ermöglichen (Laurencin et al., 1999).

Die Verwendung gewebespezifischer autologer Zellen hat sich bereits in der Klinik bewährt, wie z.B. die autologe Chondrozytentransplantation, die Transplantation von Knochenmark und der Einsatz künstlicher Haut aus Keratinozyten.

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflussen Proliferation und Differenzierung von Zellen und sind für die Herstellung eines funktionellen Gewebe- oder Organkonstruktes hilfreich oder sogar notwendig. Die Möglichkeiten reichen von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, die zahlreiche Zellprozesse indu-

zieren und Gewebe modellieren, bis hin zu physikalischen Stimuli, wie Dehnung, Druck oder Änderung des O<sub>2</sub>-Partialdrucks (Bosch et al., 2002). Abhängig vom zu rekonstruierenden Gewebe werden die unterschiedlichen Prinzipien miteinander kombiniert, um das gewünschte Gewebe zu erhalten.

### **1.2.2 Strategien zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes**

Auf Versuche, rupturierte Bänder mit azellulären biologischen und synthetischen Materialien zu ersetzen und ein Einwachsen von ortsständigem Gewebe zu erreichen, folgte von Dunn et al. (1995) die erste Arbeit über zellbesiedelte Kollagenscaffolds für die Kreuzbandrekonstruktion beim Kaninchen. In dieser Arbeit wurden Bandprothesen aus quervernetzten Kollagenfasern hergestellt und mit ACL- oder Patellarsehnenfibroblasten besiedelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Fibroblasten in der Matrix proliferierten und eine neue Kollagenmatrix bildeten. Sowohl die verwendete Zellart als auch die Matrix beeinflussten hierbei die Versuchsergebnisse.

Huang et al. (1993) stellten bandähnliche Strukturen her, indem sie dermale Fibroblasten in ein Kollagengel einbrachten. Sie wiesen eine Zunahme der Bandfestigkeit unter mechanischem Stress nach.

Bellincampi et al. (1998) besiedelten Kollagenscaffolds mit Fibroblasten aus Kreuzband und Haut für eine Implantation in das Kniegelenk bzw. das Subkutangewebe beim Kaninchen. Die Ergebnisse zeigten, dass mit Zellen besiedelte Konstrukte im Kniegelenk stabil blieben. Die vollständige Auflösung des Kollagens nach acht Wochen verhinderte jedoch weitergehende Untersuchungen.

Ein komplexeres Bandmodell wurde 1997 von Goulet et al. vorgestellt. Die Gruppe hatte ein Kreuzbandkonstrukt aus in Kollagen Typ I-Hydrogel gegossenen, humanen ACL-Fibroblasten entwickelt. Die Besonderheiten hierbei waren die Einarbeitung von lebenden Zellen in die Matrix, der Verzicht auf quervernetzende Reagentien und die endständigen Knochenblöcke, die zur späteren in vivo Verankerung im Kniegelenk im Sinne einer Knochen-Patellarsehnen-Knochen-Plastik dienen sollten (Goulet et al., 1997). Bezogen auf mehrere Studien, die gezeigt hatten, dass mechanische Stimulation die Struktur

und Histologie von Geweben ändern und ein Remodeling von Bändern bewirken kann, wurden die Konstrukte in einer Fortführung der Versuche zyklischer Dehnung in einem speziell hierfür entworfenen Bioreaktor ausgesetzt (Amiel et al., 1984; Langelier et al., 1999; Goulet et al., 2000). Die Stimulation induzierte die Fibroblasten zur Organisation der umgebenden Kollagenmatrix. Die Zugfestigkeit des Konstruktes betrug jedoch nur einen Bruchteil eines natürlichen Bandes.

Ibarra et al. (1996) berichteten von der Entstehung einer bandähnlichen Struktur bei der Verwendung von Kreuzbandfibroblasten, die sie auf eine Matrix aus Polyglykolsäure aufbrachten und für mehrere Wochen Ratten subkutan implantierten.

Lin et al. (1999) verwendeten ein synthetisches, biodegradierbares Dexon-II-Polymer als Scaffold für ACL- und MCL-Zellen. Sie nutzten eine Durchmischung des Kulturmediums durch einen Shaker zur mechanischen Stimulation der Zellen. Außerdem erfolgte die Zugabe von Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ 1, EGF), um deren Einfluss auf Proliferation und Matrixsynthese zu untersuchen. Die Zellen proliferierten schnell, produzierten neue extrazelluläre Matrix und modellierten die einzelnen Fasern des Polymers zu einem Bündel. Inwieweit das Konstrukt an die Zugfestigkeit eines normalen Kreuzbandes heranreichte, wurde jedoch nicht beschrieben.

Multipotente mesenchymale Stammzellen wurden erstmals von Altman et al. (2002a) als Zellsubstrat zur Herstellung eines künstlichen Kreuzbandes eingesetzt. Sie erzielten gute Erfolge hinsichtlich des Bandersatzes, indem sie Scaffolds aus dünnen Seidenfasern mit MSCs besiedelten.

Trotz vielfältiger Versuche ist es bis heute nicht gelungen, ein Kreuzbandkonstrukt aus Zellen und Trägermaterial herzustellen und in vitro so zu kultivieren, dass es in ausreichendem Maße die gewünschte Struktur und mechanischen Eigenschaften eines natürlichen Kreuzbandes aufwies.

### **1.3 Fragestellung**

Die Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen für die Rekonstruktion von defektem oder erkranktem Gewebe des muskuloskeletalen Systems hat neue, zukunftsreiche Perspektiven eröffnet. Ziel der vorliegenden Arbeit war die in vitro Herstellung eines Kreuzbandersatzes unter zyklischer Dehnung aus mesenchymalen Stammzellen und einem Kollagen Typ I-Hydrogel. Zunächst sollten Fibroblasten, isoliert aus dem vorderen Kreuzband, und mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark morphologisch, immunhistochemisch und mittels RT-PCR verglichen werden, um eine Aussage über Gemeinsamkeiten der beiden Zelltypen zu treffen. Weiterhin sollte ein Kreuzbandkonstrukt in vitro aus einem Kollagen Typ I-Hydrogel und mesenchymalen Stammzellen in Form einer Knochen-Sehnen-Knochenplastik hergestellt werden. Um eine bessere Matrixsynthese und Zugfestigkeit zu erreichen, galt es, das hergestellte Konstrukt unter zyklischer Dehnung in einem speziell dafür hergestellten Bioreaktor zu kultivieren. Die Untersuchungen sollten darüber hinaus Aufschluss geben, inwiefern es möglich ist, aus humanen mesenchymalen Stammzellen in einem geeigneten Trägermaterial ein Konstrukt, das einer Ligamentum-patellae-Plastik entspricht, in vitro herzustellen. Im Weiteren sollten Erkenntnisse über die Auswirkung von zyklischer Dehnung auf die extrazelluläre Matrixsynthese mesenchymaler Stammzellen gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Isolierung und Kultivierung humaner ACL-Fibroblasten

Humane Fibroblasten wurden aus dem intakten vorderen Kreuzband von Patienten, denen eine Knieendoprothese eingesetzt wurde, isoliert. Die Verarbeitung des Bandes erfolgte direkt nach Erhalt aus dem Operationssaal unter sterilen Bedingungen. Auf einem Tablett wurde es unter der Sicherheitswerkbank mit einem Skalpell von periligamentärem Gewebe gereinigt und in kleine Stücke geschnitten. Das zerkleinerte Material wurde mit einer Pinzette in zwei 5 ml Vials mit jeweils 3 ml Fibroblastenkulturmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) überführt und mit einer Schere für 5 min zerkleinert. Der Inhalt der beiden Vials wurde mit Fibroblastenmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, fünfmal mit 40 ml Fibroblastenmedium gewaschen, der Überstand jeweils abgesaugt und verworfen. Es wurden zwischen 5 und 10 ml ACL-Gewebe gewonnen. Dieses wurde mit 100 ml für den Kollagenaseverdau frisch angesetzttem Enzymmedium (DMEM/HAM'S F12 + 1% Penicillin/Streptomycin + 200 U/ml Collagenase XI vermischt, gelöst und durch ein Sterilsieb filtriert) in einen 200 ml Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer überführt und für 4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> verdaut. Der Überstand wurde vom Gewebe abpipettiert und in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 min wurden die Pellets in 20 ml Fibroblastenkulturmedium resuspendiert und in einer 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Das Gewebe wurde ebenfalls in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal mit Fibroblastenmedium gewaschen, der Überstand abgesaugt und verworfen. Das gewaschene Gewebe wurde in 20 ml Fibroblastenmedium aufgenommen und in einer 150 cm<sup>2</sup> Flasche ausplattiert.

Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel mit Fibroblastenmedium durchgeführt. Zur Vermehrung der Zellen wurden sie kurz vor Erreichen der Konfluenz mit Trypsin abgelöst. Das Medium wurde abgesaugt und die präkonfluenten Zellen mit 7 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37° C inkubiert. Das Trypsin wurde mit 14 ml Fibroblastenmedium inaktiviert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 min

wurde das gewonnene Pellet in 20 ml Fibroblastenmedium resuspendiert und die Zellen in 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

## **2.2 Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark**

MSCs wurden aus dem Hüftkopf von Patienten, denen eine Hüftendoprothese implantiert wurde, nach einem modifizierten Protokoll von Haynesworth et al. (1992) isoliert (Nöth et al., 2002b). Spongiöser Knochen wurde mit einem scharfen Löffel auf einem sterilen Tablett unter der Sicherheitswerkbank aus dem Hüftkopf gewonnen. 5-10 ml Gewebe wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 20 ml DMEM/HAM'S F12 gegeben, gevortext, um die Knochenmarkszellen von den Knochen trabekeln herauszulösen, und anschließend bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet aus Zellen und Knochenstücken wurde in 10 ml Stammzellkulturmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin + 0,1% Ascorbat-2-Phosphat) aufgenommen und gevortext, der fetthaltige Überstand wurde abgesaugt. Die aus dem trabekulären Knochen gelösten Zellen in der Suspension wurden mit einer 10 ml Spritze und einer 20 G Nadel in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt, bis die Zellen größtenteils aus dem Knochen gelöst waren und dieser gelblich-weiß erschien. Die gewonnenen Zellen wurden bei 1600 G für 5 min zu einem Pellet zentrifugiert und dieses in Stammzellmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 8 bis 10 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt, mit Stammzellmedium auf 20 ml Inhalt aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt und die adhärenen Stammzellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Flaschen wurden wieder mit 20 ml Stammzellmedium aufgefüllt und dieses alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Das Passagieren wurde, wie für die ACL-Fibroblasten beschrieben (siehe 2.1), durchgeführt.

### **2.3 Herstellung des Kollagengels**

Das Kollagen Typ I-Hydrogel stellte freundlicherweise die Firma Ars Arthro AG in Esslingen zur Verfügung, nachdem mehrere Versuche misslangen, ein für unsere Bedürfnisse ausreichend stabiles Gel aus kommerziell erhältlichem Kollagenpulver (Collagen Typ III; Sigma) und Kollagenlösung (Collagen Typ I from rat tail cellculture; Sigma) zu produzieren.

Für die Herstellung des Kollagengels wurden zwei Lösungen verwendet, die beide gebrauchsfertig von der Firma Ars Arthro geliefert wurden:

#### **1. Kollagen Typ I-Lösung:**

Kollagen wurde aus Rattenschwanzsehnen isoliert und in 0,1% Essigsäure gelöst. Diese hochvisköse Flüssigkeit mit einem pH-Wert von 4 wurde bei minus 20°C gelagert. Zum Verarbeiten wurde die Lösung aufgetaut, kurz abzentrifugiert, um alle Luftblasen zu entfernen, und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

#### **2. Gelneutralisationslösung:**

Diese Lösung besteht aus einem Zellkulturmedium mit einer starken Pufferkapazität, um einerseits Zellen aufnehmen und andererseits den sauren pH-Wert der Kollagenlösung abpuffern zu können. Die Neutralisationslösung wurde ebenfalls bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Lösung 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen blasenfrei gemischt und für 30 min zum Gelieren in den Brutschrank gegeben.

### **2.4 Herstellung des Kreuzbandkonstruktes**

Alle Herstellungsschritte des Kreuzbandkonstruktes wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

Am Vortag der Konstruktherstellung wurden von einem Stück zylindrischer demineralisierter Knochenmatrix (Durchmesser: 0,8 cm) zwei etwa 0,8 cm lange Knochenblöcke abgeschnitten. Diese wurden knapp unter der Oberfläche mit einer Injektionsnadel quer durchstochen und ein nicht resorbierbarer Faden durch das Loch gezogen und verknotet. Die Knochenblöcke wurden mit den angeknöteten Fäden in eine sterilen Petrischale gelegt und über Nacht durch UV-Licht sterilisiert. Eine 2,5 ml Injektionsspritze wurde knapp unterhalb der

Ausspritzöffnung mit einem Skalpell abgeschnitten. Der Stopfen der Spritze wurde bis zum Anschlag nach unten gezogen, um eine möglichst lange, zylindrische Ausgussform für das Kreuzband zu erhalten. In die präparierte Spritze wurde ein Knochenblock mit dem Faden nach unten eingeführt.

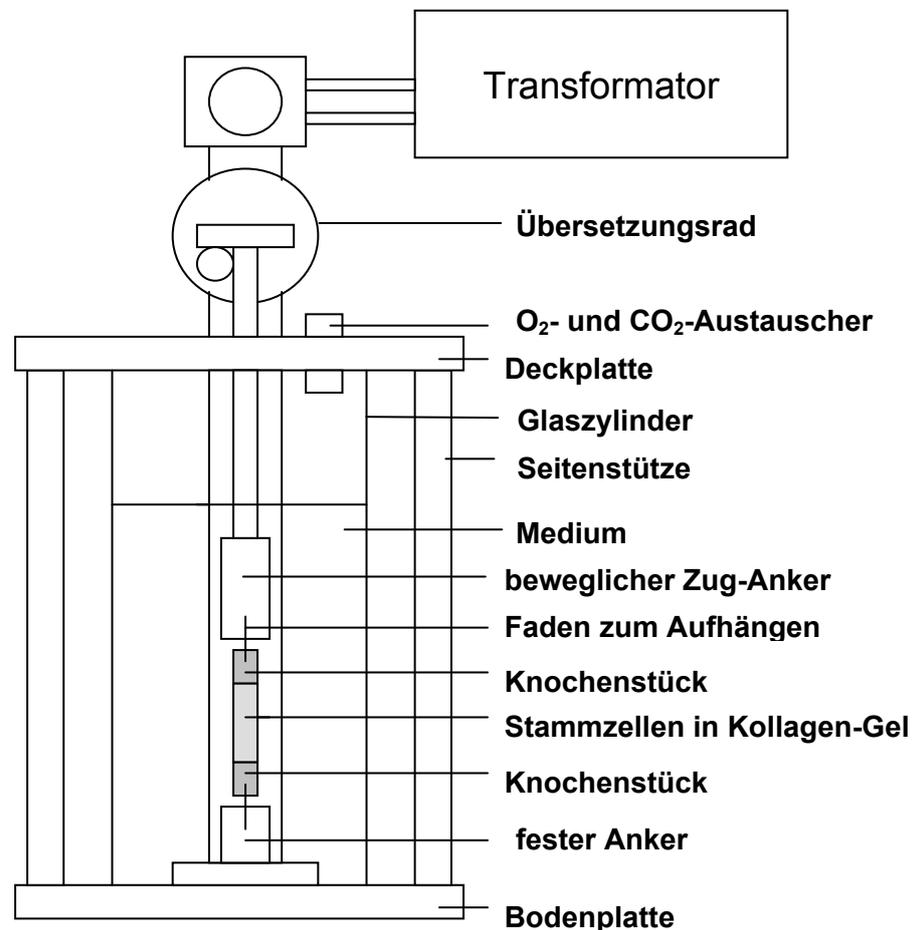
Zur Herstellung eines Kreuzbandkonstrukts wurden 3 ml Kollagengel verwendet. Während 1,5 ml Kollagen Typ I-Lösung auf Eis aufbewahrt wurde, wurden Stammzellen aus einer konfluenten Zellkulturflasche, wie oben beschrieben, abtrypsinisiert und in der Neubau-Kammer ausgezählt. Pro Milliliter Kollagengel verwendeten wir für Vorversuche  $1 \times 10^6$  Stammzellen. Wegen zu starker Kontraktion des Gels wurden bei nachfolgenden Versuchen nur noch  $5 \times 10^5$  Zellen verwendet. Diese wurden in 1,5 ml Gelneutralisationslösung aufgenommen und gut vermischt. Kollagenlösung und Neutralisationslösung wurden mit einer 2 ml Pipette vorsichtig miteinander vermengt, um die Entstehung von Luftbläschen zu vermeiden. Das Gel-Zell-Gemisch wurde mit einer Pipette in die mit dem Knochenblock gefüllte Spritze gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der untere Knochenblock vollständig mit Gel durchtränkt und so ein Anhaften des Blockes an das Gel gewährleistet wurde. Vor dem Aufsetzen des zweiten Knochenblockes mit dem Faden nach außen wurde die Spritze vollständig mit Medium gefüllt, um Blasen an der Oberfläche zu vermeiden, die ein sicheres Anhaften des oberen Blockes verhindert hätten. Das fertige Konstrukt wurde anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und dieses zunächst für 10 min, bis das Gel angeliert war, aufrecht stehend im Brutschrank aufbewahrt, um ein Herausfließen des Gels aus der Spritze zu verhindern. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen 20 min liegend im Brutschrank gelagert, da Vorversuche gezeigt hatten, dass das Gelieren im Liegen das Anheften der Knochenblöcke verbesserte. Nach insgesamt 30 min konnte das Kreuzband vorsichtig aus der Spritze in eine sterile Petrischale gepresst werden, indem man den Stopfen wie beim Injizieren nach vorne drückte. Die Petrischale wurde bis knapp oberhalb des Konstruktrandes mit Konstruktmedium (DMEM/HAM'S F12 (1x) + 10% FBS + 1% Antibiotic/Antimycotic Solution) aufgefüllt, um das Konstrukt zu ernähren und eine

Verunreinigung der Petrischale, die teilweise über mehrere Wochen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank stand, zu verhindern.

## 2.5 Bioreaktor und zyklische Dehnungsversuche

### 2.5.1 Bioreaktor

Zur mechanischen Stimulation des Kreuzbandkonstruktes wurde von Prof. Dr.-Ing. Thull, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg, ein Bioreaktor entworfen und gebaut. Die Vorlagen dazu stammen von Goulet et al. (1997) (Abb 1 A).



**Abb. 1 A:** Schematische Darstellung des Bioreaktors

Vor der Benutzung des Bioreaktors wurde dieser mit Alufolie bedeckt, bei 121°C im Dampfsterilisator sterilisiert und anschließend getrocknet. Der sterile Bioeaktor wurde unter der Sicherheitswerkbank zerlegt und das Konstrukt eingebracht. Das Kreuzbandkonstrukt wurde mit einem Faden an dem unteren, feststehenden Anker und mit dem anderen an dem oberen, beweglichen Anker festgeknotet. Nach dem Zusammenbauen des Bioreaktors, bei dem besonders das gleichmäßige Festziehen der oberen Halteschrauben beachtet werden musste, um eine Dichtigkeit des Reaktors zu erreichen, wurde dieser über eines der Löcher in der Deckplatte bis über den beweglichen Anker mit Medium (DMEM/HAM'S F12 + 10% FBS + 1% Antibiotic/Antimycotic Solution) aufgefüllt. Die Öffnungen der Platte wurden mit Filterpapier abgeklebt, um den Innenraum des Reaktors steril zu halten. Dieser wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert (Abb. 1B).



**Abb. 1 B:** Kreuzbandkonstrukt eingespannt in den Bioreaktor zur zyklischen Dehnung

## **2.5.2 Zyklische Dehnungsversuche**

Es wurden zwei Gruppen von Kreuzbandkonstrukten hinsichtlich des Effekts der zyklischen Dehnung auf histologische und mechanische Eigenschaften miteinander verglichen.

### *Statische Gruppe:*

Die Kreuzbandkonstrukte wurden nach der Herstellung 3 Wochen liegend in einer Petrischale im Brutschrank kultiviert. Es erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel.

### *Zyklische Dehnungsgruppe:*

Die Kreuzbandkonstrukte wurden nach ihrer Herstellung eine Woche liegend in einer Petrischale im Brutschrank kultiviert, danach 2 Wochen in den Bioreaktor eingespannt und durch zyklische Dehnung stimuliert. Hier war wegen der großen Mediummenge innerhalb der Einspannzeit kein Mediumwechsel notwendig.

Über zwei Kabel war der Bioreaktor mit einem Transformator verbunden, der die Stromversorgung für den Motor lieferte und über dessen Spannung die Dehnungsfrequenz festgelegt werden konnte.

Über einen speziellen Mechanismus an dem beweglichen Anker konnte die Dehnungsamplitude eingestellt werden.

Es wurde eine Dehnungsfrequenz von 1 Hz und eine Dehnungsamplitude von 0,5 cm gewählt.

## **2.6 Histologie**

### **2.6.1 Aufbereitung der Zellen und Konstrukte**

#### *Zellen:*

In Chamber slides wurden pro Well  $2 \times 10^4$  ACL-Fibroblasten in andere mesenchymale Stammzellen ausgesät. Nach 24 h im Brutschrank wurden die

Zellen mit PBS (pH=7,4) gespült, 10 min in Aceton fixiert, 15 min getrocknet und anschließend bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

#### *Kreuzbandkonstrukte:*

Der Kollagenanteil der Konstrukte wurde mit einem Skalpell von den endständigen Knochenblöcken abgelöst und das Band halbiert, so dass eine Hälfte zur RNA-Isolierung und die andere Hälfte für histochemische bzw. immunhistochemische Färbungen benutzt werden konnte.

Die Konstrukt hälften für Färbungen wurden mit PBS gespült und in Tissue Tec so eingebettet, dass das Band längs geschnitten werden konnte. Zum Einfrieren wurde das Gefäß mit einer Pinzette für 1 min in flüssigen Stickstoff gehalten und anschließend bei minus 20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Am Kryostat wurden von dem eingefrorenen Konstrukt 12 µm dicke Schnitte gefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Nachdem die Objektträger über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet waren, wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei minus 20°C aufbewahrt.

Zum Vergleich wurde ein intaktes humanes Kreuzband, das bei der Implantation einer Knieendoprothese reseziert wurde, den Konstrukten entsprechend verarbeitet.

Vor dem Färbevorgang wurden die Objektträger 10 min in Aceton fixiert und anschließend 15 min getrocknet.

### **2.6.2 Histochemische Färbungen**

Von jedem Konstruktband wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E), eine Sirius-Rot-Färbung, eine Trichromatfärbung nach Masson-Goldener und eine Azanfärbung nach Haidenhain angefertigt.

#### *H/E-Färbung:*

Die Objektträger wurden zunächst 10 min mit Hämalaun nach Mayer gefärbt und 10 min mit Leitungswasser fließend gewässert. Anschließend wurden sie 10 sec in 1% Eosin gehalten, bevor die aufsteigende Alkoholreihe mit 2 mal 2 min 100% Ethanol, 5 min Xylol II und 5 min Xylol I durchgeführt wurde. Die Objektträger wurden zur Fixierung in Entelan eingedeckt.

#### *Sirius-Rot-Färbung:*

Nachdem die Objektträger 2 min in Aqua dest. standen, wurden diese 10 min fließend gewässert und 3 min in Picro-Sirius Rot F3BA gefärbt. Die Schnitte wurden dreimal kurz in 100% Ethanol entwässert und eine aufsteigende Alkoholreihe mit abschließender Eindeckung in Entelan durchgeführt.

#### *Trichromat-Färbung:*

Die Objektträger wurden 2 min in Hämatoxylin nach Weigert gefärbt, kurz mit Aqua dest. gespült und anschließend 10 min fließend gewässert. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurden diese für 5 min in Ponceau-Säurefuchsin gestellt und danach, wie auch zwischen den folgenden Färbeschritten, mit 1% Essigsäure gespült. Die Schnitte wurden mit Wolframatophosphorsäure-Orange G differenziert und nach Spülen mit 1% Essigsäure 5 min mit Lichtgrün gefärbt. Nach erneutem Spülen wurde eine aufsteigende Alkoholreihe mit je 5 min 50%, 70%, 80%, 96% und zweimal 100% Ethanol durchgeführt. Zum Abschluss folgten 2 mal 5 min Xylol II und Xylol I und ein Eindecken in Entelan.

#### *Azanfärbung:*

Nach Einstellen in Aqua dest. wurden die Objektträger 60 min bei 56°C mit vorgewärmtem Kernfarbstoff Azocarmin gefärbt und anschließend in Aqua dest. gegeben. Im Folgenden wurden sie 2 min in Anilinalkohol differenziert und die Differenzierung mit Essigsäurealkohol nach 1 min beendet. Die Schnitte wurden 60 min in Wolframatophosphorsäure gefärbt und nach Spülen mit Aqua dest. für 2 min in Anilinblau-Orange G gestellt. Danach wurden sie 5 min in 96% Ethanol gegeben und die aufsteigende Alkoholreihe mit Eindecken wie bei der H/E-Färbung durchgeführt.

### **2.6.3 Immunhistochemische Färbungen**

Zur Darstellung der Verteilung der extrazellulären Matrixproteine Kollagen I, Kollagen III, Elastin, Fibronectin und Vimentin wurden die Kreuzband- und Konstruktschnitte immunhistochemisch gefärbt.

Für die Elastinfärbung war eine Vorbehandlung nötig. Die entsprechenden Objektträger wurden zuerst mit 20 mM Tris (pH = 8,0) befeuchtet, danach 15

min bei Raumtemperatur mit 6 M Guanidin HCL, 50 mM DTT in 20 mM Tris inkubiert. Nach Spülen mit 20 mM Tris wurden die Objektträger 15 min im Dunkeln mit 100 mM Iodoacetamide inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit 20 mM Tris gewaschen und zu den anderen Schnitten in Tris-NaCl (pH = 7,4), mit dem auch immer zwischen den Färbeschritten gespült wurde, gestellt. Die Gewebeschnitte wurden für 15 min mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-Puffer vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C mit den primären Antikörpern Kaninchen anti Kollagen I (IgG; Verdünnung 1:40), Kaninchen anti Kollagen III (IgG; Verdünnung 1:40), Kaninchen anti Elastin (IgG; Verdünnung 1:50), Maus anti Fibronectin (IgG; Verdünnung 1:100) und Maus anti Vimentin (IgM; Verdünnung 1:50) in 0,5% BSA inkubiert. Zur Markierung der entstandenen Ag-Ak-Komplexe wurden die Schnitte am nächsten Tag für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit den zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (Verdünnung 1:50) Ziege anti Kaninchen (IgG), Kaninchen anti Maus (IgG) und Ziege anti Maus (IgM) inkubiert. Anschließend wurden die dritten Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:50) Kaninchen anti Ziege (IgG,IgM) und Ziege anti Kaninchen (IgG) für 30 min bei den gleichen Bedingungen aufgetragen. Die Peroxidase-gekoppelten Antikörper waren mit einem Gemisch aus 30% AB-Plasma in PBS (pH = 7,4) verdünnt. Die Darstellung der Komplexe erfolgte über das Auftragen von Diaminobenzidine Peroxidase Substrat (DAB-Tabletten gelöst in Aqua dest.) für 2 min. Anschließend wurden die Objektträger 3 mal mit Aqua dest. gewaschen, 5 min mit Hämalaun gefärbt, 15 min unter fließendem Wasser gespült und in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

## **2.7 RT-PCR**

### **2.7.1 Aufbereitung der Zellen und Konstrukte**

*Zellen:*

5 x 10<sup>5</sup> ACL-Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen wurden jeweils 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert und die Pellets anschließend in 500 µl RLT-

Puffer mit 5 µl Mercaptoethanol gelöst und bis zur Weiterverwendung bei minus 80°C eingefroren.

#### *Konstrukte:*

Bei den Kollagenkonstrukten wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen.

Die Konstrukthälfte für die RNA-Isolierung wurde unter dem Abzug mit PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen, und mit 5 ml GTC-Puffer (500 µg Mercaptoethanol + 0,7 g Sarkosyl + 2,5 ml Natriumacetat pH=4.3 ad 100 ml Aqua dest.) in ein 5 ml Glasgefäß gegeben. Mit einer Schere wurde das Konstrukt zerkleinert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach gründlichem Vortexen wurden 500 µl 2 M NaCl, 5 ml Phenol gesättigt mit Citratpuffer und 1,4 ml Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde gevortext und anschließend bei 3500 U/min für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere RNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und mit 8 ml Isopropanol bei minus 80°C ausgefällt. Nach einer Stunde wurde die RNA bei 3500 U/min für 15 min bei 4°C pelletiert und das Pellet in 500 µl RLT-Puffer mit 5 µl Mercaptoethanol gelöst und eingefroren.

#### **2.7.2 RNA-Isolierung**

RNA wurde aus den Pellets mit dem RNeasy Mini Kit zur Gewinnung totaler RNA isoliert.

Zu dem in 500 µl Puffer gelösten Pellet wurden 500 µl 70% Ethanol gegeben und gemischt, um das Lysat zu reinigen. Dieses wurde durch Zentrifugation für 15 sec bei 10000 U/min über eine RNeasy Mini Spin Säule in ein 2 ml Sammelgefäß überführt. Die Flüssigkeit im Gefäß wurde verworfen, da sich die RNA in der Säule gesammelt hatte. Nach Aufpipettieren von 700 µl RW1-Puffer und Waschen der RNA durch Zentrifugation wurde ein neues Sammelgefäß verwendet, 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Gefäß wurde verworfen und erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und anschließend 2 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Um die RNeasy-Membran gut zu trocknen, wurde die Säule in ein

neues Sammelgefäß gegeben und 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde verworfen und zur Eluation der RNA 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy-Membran pipettiert. Durch Zentrifugation der Säule für 1 min bei 10000 U/min erhielt man 30 µl RNA-Probe im Sammelgefäß.

Im Biophotometer wurde anschließend der RNA-Gehalt der Probe bestimmt.

### **2.7.3 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zu dieser wurde 1 µl Oligo(dt)Primer gegeben, bei 70°C 10 min erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Zentrifugieren und Zugabe von 1 µl PCR Nucleotide Mix (10 pmol), 4 µl M-MLV RT 5x Puffer, 1 µl Reverse Transcriptase und Auffüllen mit HPLC-Wasser auf 20 µl wurde das Gemisch für 50 min bei 42°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Reversen Transkriptase wurde die geschriebene cDNA für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend mit HPLC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

### **2.7.4 Polymerase-Ketten-Reaktion und Gelelektrophorese**

Bei einer PCR werden bestimmte Abschnitte des Genoms mit Hilfe selektiver Primer exponentiell amplifiziert. Durch die Wahl der verwendeten Primer kann der Abschnitt, der vervielfältigt werden soll, genau festgelegt werden. Verwendet wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Sequenzen für GAPDH, Kollagen I, Kollagen III, Elastin, Fibronectin und Vimentin. Das House-keeping-Gen GAPDH diente zur Überprüfung der cDNA-Synthese.

In ein spezielles PCR-Gefäß wurden 22,5 µl HPLC-Wasser, 3 µl PCR Reaktionspuffer (10 x), 1 µl PCR Nucleotide Mix (10 pmol) und 0,5 µl Taq DNA Polymerase mit 2 µl spezifischem Primer und 1 µl cDNA pipettiert. Zur Denaturierung der DNA wurde der Mix im Thermocycler initial 3 min auf 94°C erhitzt, um nach Abkühlen ein Anlagern der Primer zu ermöglichen. Hierauf folgte eine dem jeweiligen Primer spezifische Anzahl an Reaktionszyklen (GAPDH: 40 Zyklen, Kollagen I: 35 Zyklen, Kollagen III: 30 Zyklen, Elastin: 30 Zyklen, Fibronectin: 30 Zyklen, Vimentin: 30 Zyklen), die aus Denaturierung für

1 min bei 94°C, 1 min Annealing bei der spezifischen Anlagerungstemperatur des Primers (GAPDH: 62°C, Kollagen I: 54°C, Kollagen III, Elastin und Fibronectin: 58°C, Vimentin: 65°C) und 1 min Elongation bei 72° C bestanden. Abschließend folgte eine Vervollständigung der cDNA für 5 min bei 72°C. Bis zur Weiterverwendung wurde die Probe bei minus 20° gelagert.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde das Amplifikat in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde 1,5 g Agarosepulver mit 100 ml 0,5% TBE-Puffer (TBE 10 x: 10,8 g Tris-base + 5,5 g Borsäure + 4 ml EDTA ad 100 ml Aqua dest.) und 5 µl Ethidiumbromid in der Mikrowelle aufgeköcht und in eine Elektrophoresekammer mit Rechen gegossen. Nach Aushärtung des Agarosegels und Auffüllen der Kammer mit TBE-Puffer wurde je 15 µl des Amplifikats mit 1,5 µl DNA-Ladepuffer (30% Glycerol + 0,1 M EDTA + 1% SDS + 0,25% Bromphenolblau + 0,25% Xylene Cyanol ad Aqua dest) in eine Tasche gegeben und bei 140 Volt für 45 min im Gel aufgetrennt. Als Vergleichswert für die Basenpaarlänge der einzelnen DNA-Fragmente wurde in eine Geltasche ein 100 bp DNA-Marker gegeben und diese im Gel aufgetrennt. Die entstandenen DNA-Banden konnten anschließend mittels UV-Licht im UV-Densitometer sichtbar gemacht werden.

## **2.8 Chemikalien und Geräte**

### **2.8.1 Chemikalien**

Aceton, AppliChem, Darmstadt, E4913

Antibiotic Antimycotic Solution (100x), Sigma-Aldrich, Steinheim, A-5955

Borsäure, Merck, Darmstadt, 1.00165.1000

Bromphenolblau, Sigma-Aldrich, Steinheim, B-5525

BSA, Amersham, Piscataway, USA, 412

DMEM/HAM'S F-12 (1x), PAA Laboratories, Pasching, Austria, E15-813

DNA Leiter Plus 100 bp, PeQLab, Erlangen, 252020

Dimethylsulfoxid (DMSO), AppliChem, Darmstadt, A3672.0250

1,4-Dithiothreitol (DTT), Boehringer, Mannheim, 85080328-82

EDTA, Fluka Chemie, Buchs, 03700

Foetal Bovine Serum, GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, 10270-106  
Glycerol, Merck, Darmstadt, 1.04093.1000  
Glycerol Gelatine, Sigma-Aldrich, Steinheim, 1K240R3  
HPLC-Wasser, Carl Roth, Karlsruhe, A511.2  
Iodoacetamide Sigma ultra, Sigma-Aldrich, Steinheim, I-1149  
Isopropanol (=2-Propanol), Carl Roth, Karlsruhe, 6752.1  
L-Ascorbat-2-phosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim, A-8960  
2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt, 1.15433  
M-MLV RT 5x Buffer, Promega, Madison, USA, M531A  
M-MLV RT RNase H(-) Point Mutant, Promega, Madison, USA, M3682  
Natriumacetat-Trihydrat, Carl Roth, Karlsruhe, 6779.1  
NaCl, Merck, Darmstadt, 1.06404.1000  
Natronlauge-Maßlösung (1M), AppliChem, Darmstadt, A 1432.1000  
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, AppliChem, Darmstadt, A1163.0010  
Oligo(dt)Primer, Promega, Madison, USA, C1101  
PBS DULBECCO pH7, Biochrom, Berlin, 498E  
PCR Nucleotide Mix (10 pmol/each), Promega, Madison, USA, C1145  
PCR Reaction Buffer (10x), Amersham, Piscataway, USA, T0303X/93-72015  
Penicillin/Streptomycin (100x), PAA Laboratories, Pasching, Austria, P11-010  
Pepsin, Dako, Hamburg, S300230  
Phenol gesättigt mit 0,1 M Citratpuffer, Sigma-Aldrich, Steinheim, P4682  
RNase freies A.d., QUIAGEN, Maryland, USA, 1018017  
RNeasy Mini Kit, QUIAGEN, Maryland, USA, 74106  
Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine tablets, Sigma-Aldrich, Steinheim, D-4168  
Salzsäure-Maßlösung (1M), AppliChem, Darmstadt, A 1434.1000  
SDS ultra pure, Carl Roth, Karlsruhe, 2326.1  
Taq DNA Polymerase, Amersham, Piscataway, USA, T0303X/270798  
Trichlormethan/Chloroform, Carl Roth, Karlsruhe, 3313.1  
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan, Merck, Darmstadt, 1.08382.1000  
Trypsin/EDTA (1x), PAA Laboratories, Pasching, Austria, L11-004  
Wasserstoffperoxid 30%, Merck, Darmstadt, 1.08597.1000  
Xylene Cyanol, Sigma-Aldrich, Steinheim, X-4126

### 2.8.2 Antikörper

Col I, Rabbit anti-human collagen type I polyclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA, AB 745

Col III, Rabbit anti-human collagen type III polyclonal antibody, Chemicon, Temecula, USA, AB 747

Elastin, Rabbit anti-human elastin, Calbiochem-Novabiochem, San Diego, USA, MAB 1681

Fibronektin, monoclonal anti-human fibronectin (IgG), Sigma-Aldrich, Steinheim, F0916

Vimentin, mouse anti-human vimentin monoclonal antibody (IgM), Chemicon, Temecula, USA, MAB 1681

Goat-anti-Mouse, dianorva, Hamburg, 115-035-020

Goat-anti-Rabbit, dianorva, Hamburg, 111-075-045

Rabbit-anti-Goat, dianorva, Hamburg, 305-015-003

Rabbit-anti-Mouse, DAKO, Glostrup, Danmark, Z0259

### 2.8.3 Primer

GAPDH	Sense:	GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT
	Antisense:	AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG
Col I	Sense:	GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG
	Antisense:	TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG
Col III	Sense:	GCG GAG TAG CAG TAG GAG
	Antisense:	GTC ATT ACC CCG AGC ACC
Elastin	Sense:	GCA GTG CCT GGG GTC CTT GGA G
	Antisense:	GCT GCT TTA GCG GCT GCA GCT GG
Fibronektin	Sense 1:	TGG AAC TTC TAC CAG TGC GAC
	Sense 2:	TGG AAC TTC TAC CAG TGC
	Antisense:	TGT CTT CCC ATC ATC GTA ACA C
Vimentin	Sense:	GAC CGC TTC GCC AAC TAC ATC GAC
	Antisense:	GGT CAT CGT GAT GCT GAG AAC TTT CG

**Tabelle 1:** Primersequenzen zur Testung der extrazellulären Matrixproteine.

#### **2.8.4 Materialien und Geräte**

Abzug 1500, Waldner

Accu-jet, Brand

Axioskop, Zeiss

Axiovert 25, Zeiss

Biofuge pico, Heraeus

Dampfsterilisator Varioklav VI 400EP, H+P

Einmalpipetten (steril) 2, 5, 10, 25 ml, Sarstedt

Einmalspritzen Ecoject 2ml, Dispomed

Gelelektrophoreseeinheiten B2, Owl

Heizgerät BBD 2, Grant Boekel

Kühlgefrierkombination economy, Bosch

Labofuge 400R, Heraeus

Laborbrenner, Susbeck

Magnetrührer mit Heizung M32, Hartenstein

Microtom HM 5000M, Microm

Mikrowelle NN-3206, Panasonic

Multicycler PTC 200, Biozym Diagnostik

Nadel Sterican 20G, Braun

Natural bone graft Lubbock 8 x 25 mm, Ost Development

Neubauer-Zellzählkammer, Marienfeld

Pasteurpipetten, Hartenstein

PCR Tubes und Deckel, Hartenstein

Petrischalen, Biochrom

PH-meter inoLab pH, WtW

Pipettenspitzen Plastibrand, 0,1 -1000 µl, Laug & Scheller

Power Supply E835, Consort

Reaktionsgefäße 1,5 ml safety cap, Sarstedt

Seralon blau 3/0, Serag Wiessner

Sicherheitswerkbank HERA safe Klasse 1, Heraeus

Superfrost Plus Objektträger, Hartenstein

Thermalprinter DTU-414, Seiko Instruments

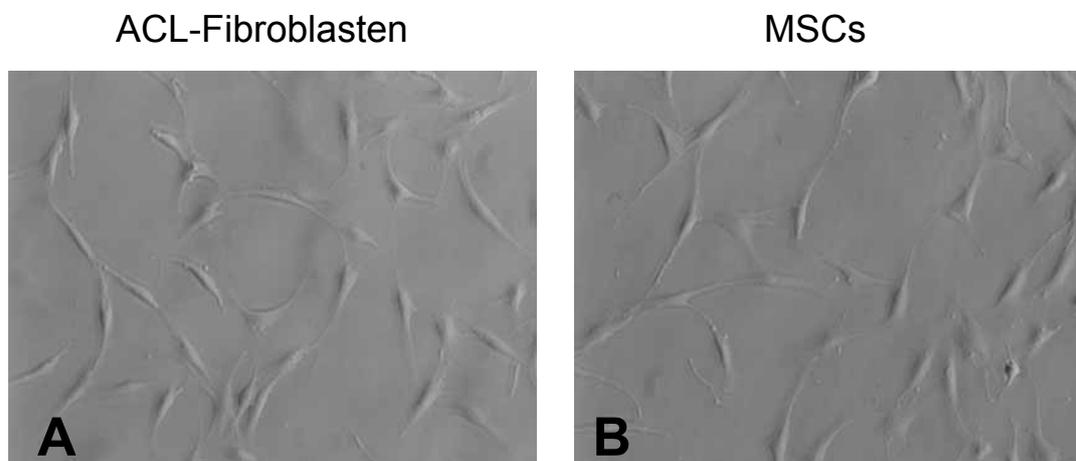
Trockenschrank T12, Kendro  
UV-Densitometer, Ltf- Labortechnik  
UV-Sterilisator UVC 30, Kendro  
Vaccucenter BVC 21 mit VaccuHand Control VHC, Biochem  
Videocopyprozessor P91, Mitsubishi  
Vortex-Genie 2 G560, Scientific Industries  
Waage Kern 770, Kern  
Waage Scaltec, Scaltec  
Wärmeschrank BB 5060, Heraeus  
Zellkulturflaschen 150 ml, Biochrom

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen und Fibroblasten

ACL-Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurden zunächst zellmorphologisch, immunhistochemisch und bezüglich ihrer Genexpression miteinander verglichen. Die Untersuchungen wurden je dreimal mit MSCs und ACL-Fibroblasten verschiedener Spender durchgeführt.

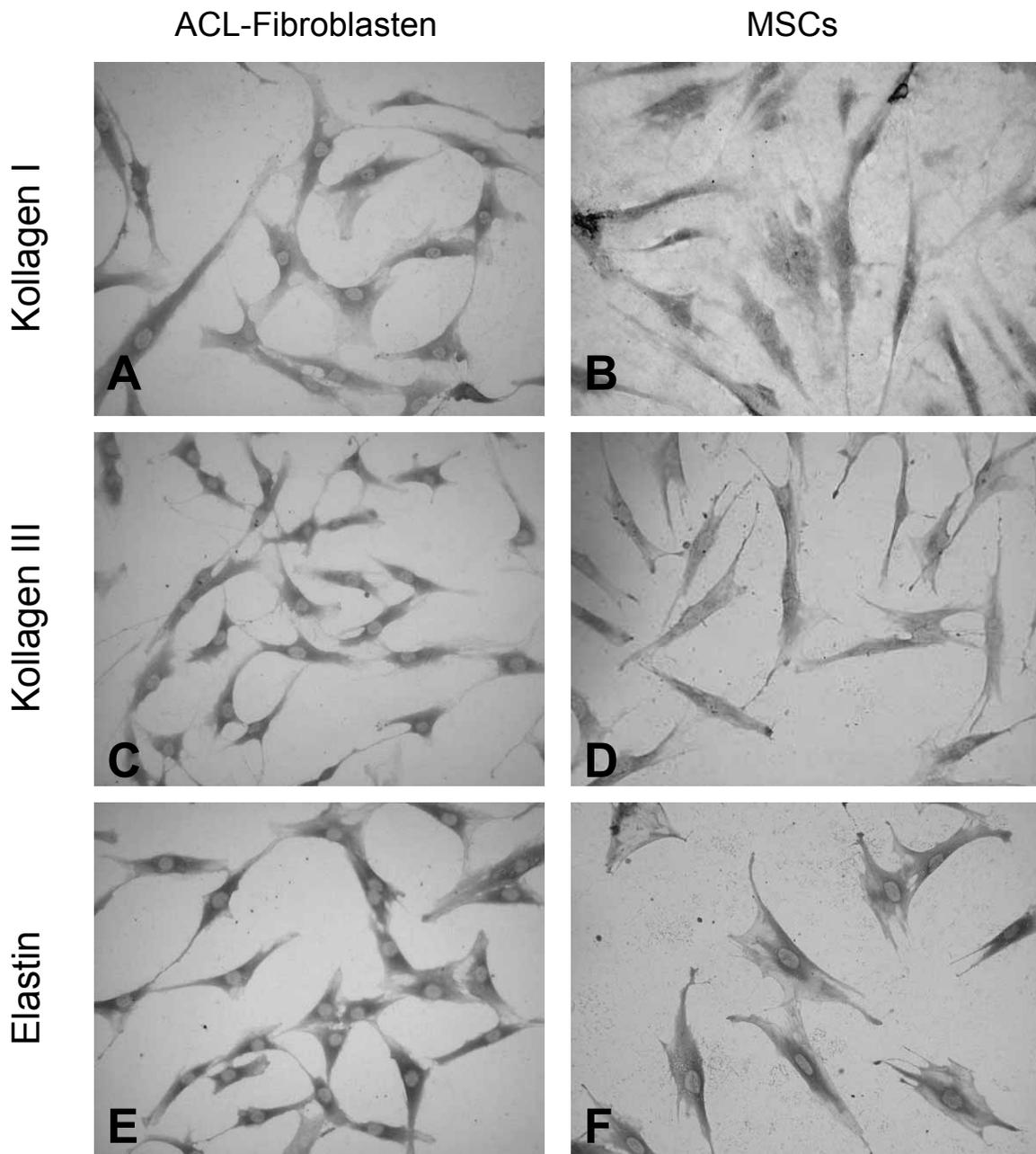
#### 3.1.1 Zellmorphologie



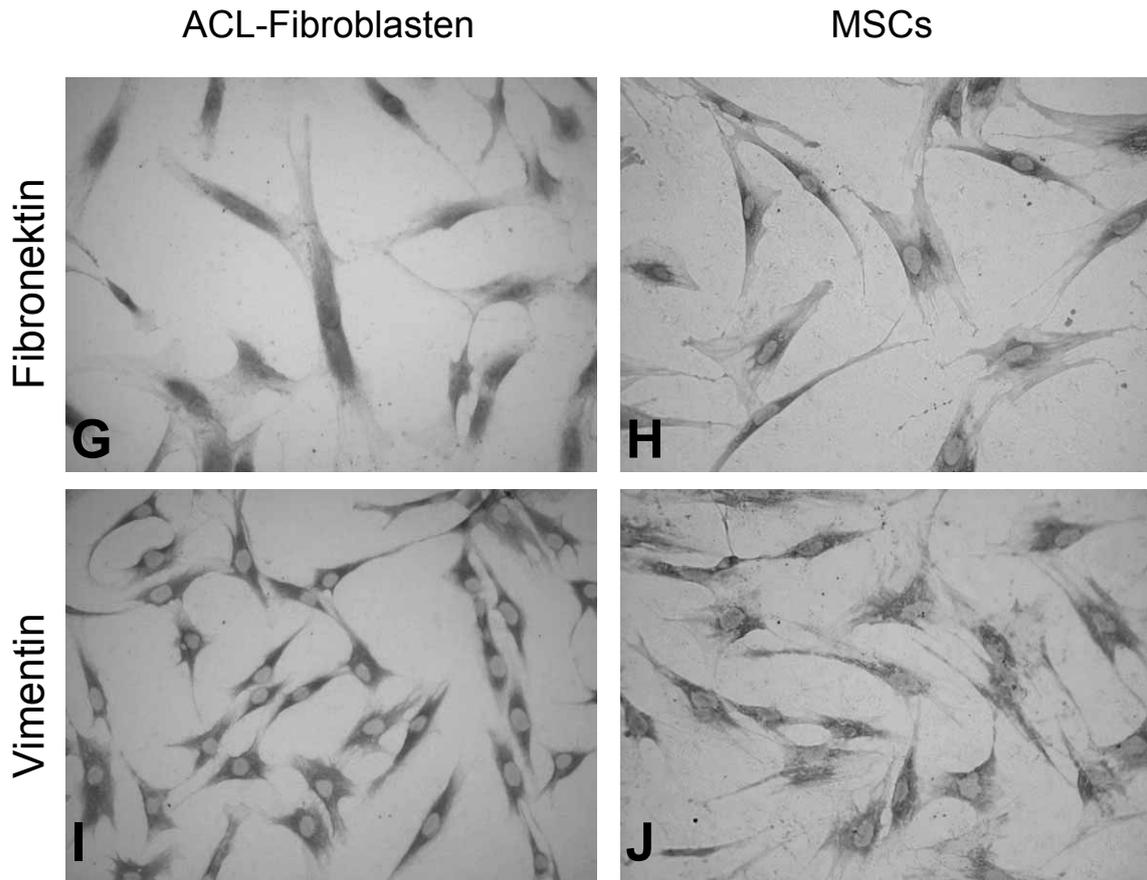
**Abb. 2 A und B:** Lichtmikroskopische Darstellung von (A) ACL-Fibroblasten und (B) MSCs. Vergrößerung 200-fach, Kulturdauer 7 Tage.

Morphologisch waren zwischen Fibroblasten aus dem vorderen Kreuzband (Abb. 2 A) und MSCs aus dem Knochenmark (Abb. 2 B) keine Unterschiede zu erkennen. Beide zeigten einen fibroblastären Zelltyp und stellten sich spindelförmig dar.

### 3.1.2 Immunhistochemische Färbungen



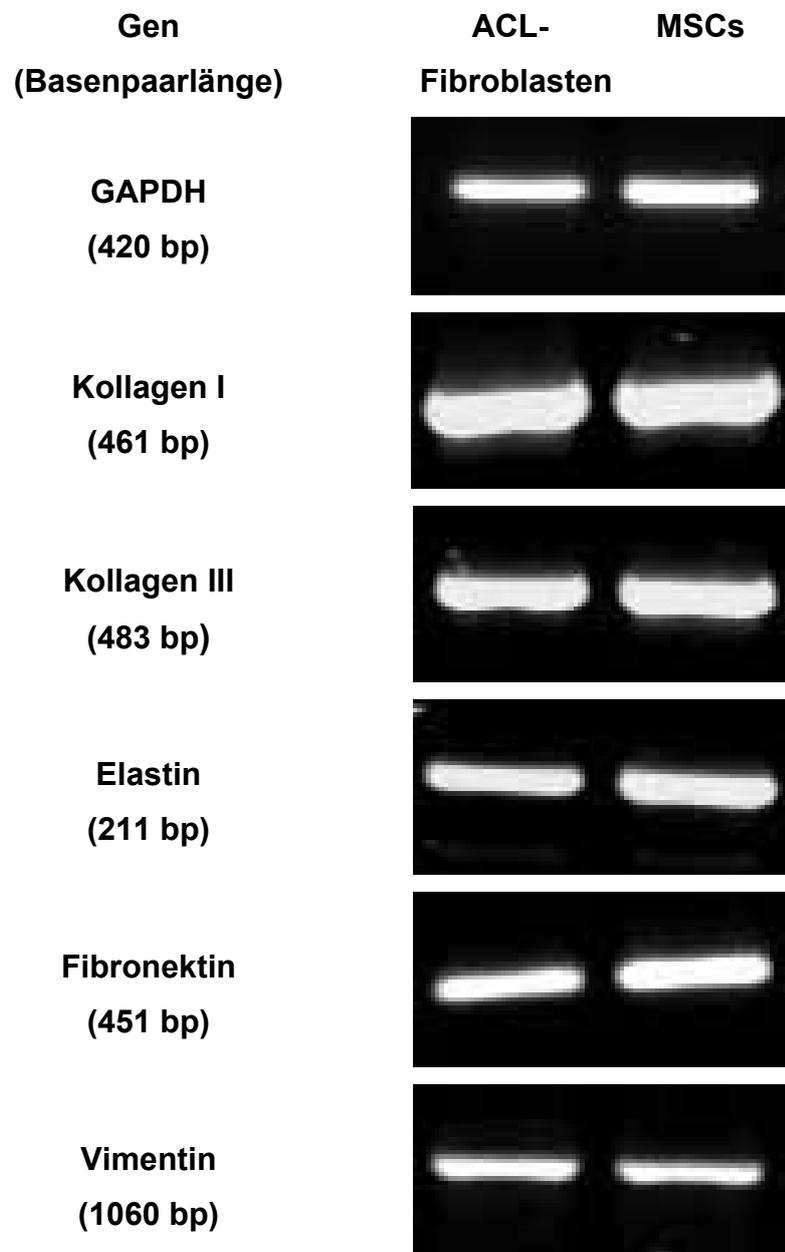
**Abb 3 A - F:** Immunhistochemische Analysen von ACL-Fibroblasten und MSCs aus dem Knochenmark. Dargestellt sind Kollagen I (A und B), Kollagen III (C und D), Elastin (E und F), Vergrößerung 200-fach, Kulturdauer 7 Tage.



**Abb. 3 G - J:** Immunhistochemische Analysen von ACL-Fibroblasten und MSCs aus dem Knochenmark. Dargestellt sind Fibronectin (G und H) und Vimentin (I und J). Vergrößerung 200-fach, Kulturdauer 7 Tage.

Die immunhistochemischen Färbungen der beiden untersuchten Zelltypen ACL-Fibroblasten und MSCs wiesen bezüglich Farbintensität und -verteilungsmuster der untersuchten extrazellulären Matrix-Proteine Kollagen I, Kollagen III, Elastin, Vimentin und Fibronectin ein identisches Ergebnis auf (Abb. 3 A - J). Somit konnten in beiden Zellarten die oben genannten Proteine zytoplasmatisch nachgewiesen werden, ohne dass mikroskopisch eine signifikante Differenz im Hinblick auf die Verteilung oder Menge der untersuchten Proteine festzustellen war.

### 3.1.3 RT-PCR



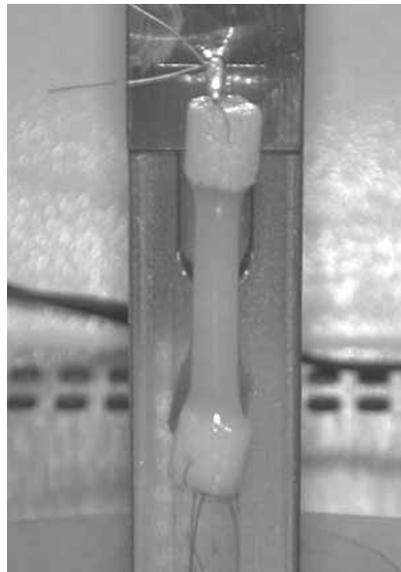
**Abb. 4:** RT-PCR-Analyse für die Genexpression von Kollagen I, Kollagen III, Elastin, Fibronectin und Vimentin von Fibroblasten aus dem vorderen Kreuzband, verglichen mit MSCs aus dem Knochenmark. GAPDH wurde als House-keeping-Gen verwendet. Kulturdauer 7 Tage.

Die qualitativen RT-PCR-Analysen zeigten zwischen ACL-Fibroblasten und MSCs ein einheitliches Ergebnis hinsichtlich der Expression von mRNA der

Genprodukte Kollagen I, Kollagen III, Elastin, Fibronektin und Vimentin (Abb. 4). Unterschiede der untersuchten Zelltypen in Bezug auf die Synthese der oben genannten Proteine ließen sich PCR-analytisch nicht nachweisen.

### 3.2 Ergebnisse der Konstruktherstellung

Mit dem Kollagen Typ I-Hydrogel der Firma Ars Arthro gelang es, ein ligamentum-patellae-ähnliches Konstrukt, wie es auch klinisch eingesetzt wird, in vitro herzustellen. Mit den in das Gel eingegossenen Knochenblöcken wäre eine mögliche Verankerung in Femur und Tibia gegeben (Abb. 5).



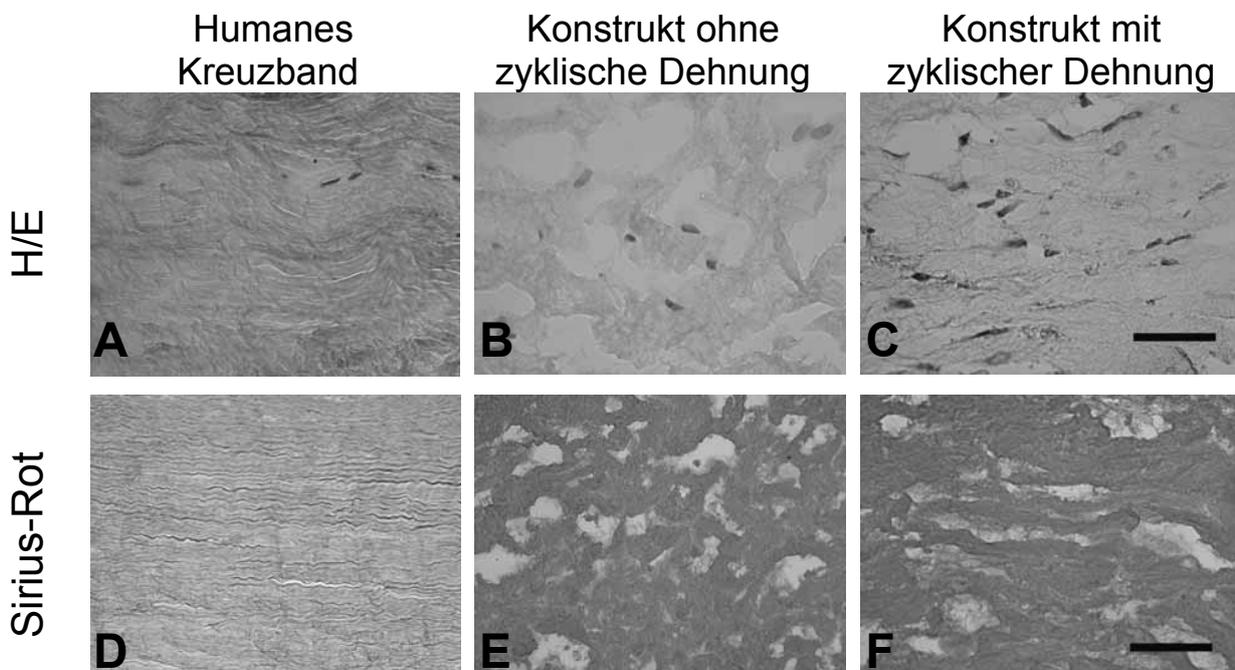
**Abb. 5:** In vitro hergestelltes Kreuzbandkonstrukt aus MSCs in einem Kollagen Typ I-Hydrogel mit randständigen Knochenblöcken für die Verankerung in Femur und Tibia. Dargestellt ist die Befestigung im Bioreaktor für die zyklische Dehnung.

Das Konstrukt konnte allerdings nicht sofort nach Herstellung im Bioreaktor befestigt werden, da es zunächst nicht stabil genug war, dem damit verbundenen Zug zu widerstehen. Deshalb wurde es eine Woche in einer Petrischale im Brutschrank kultiviert. So konnte sich das Kollagen-Gel verfestigen und durch die beginnende Produktion eigener Extrazellulärmatrix eine ausreichende Stabilität zwischen Gel und Knochenblöcken erreicht werden.

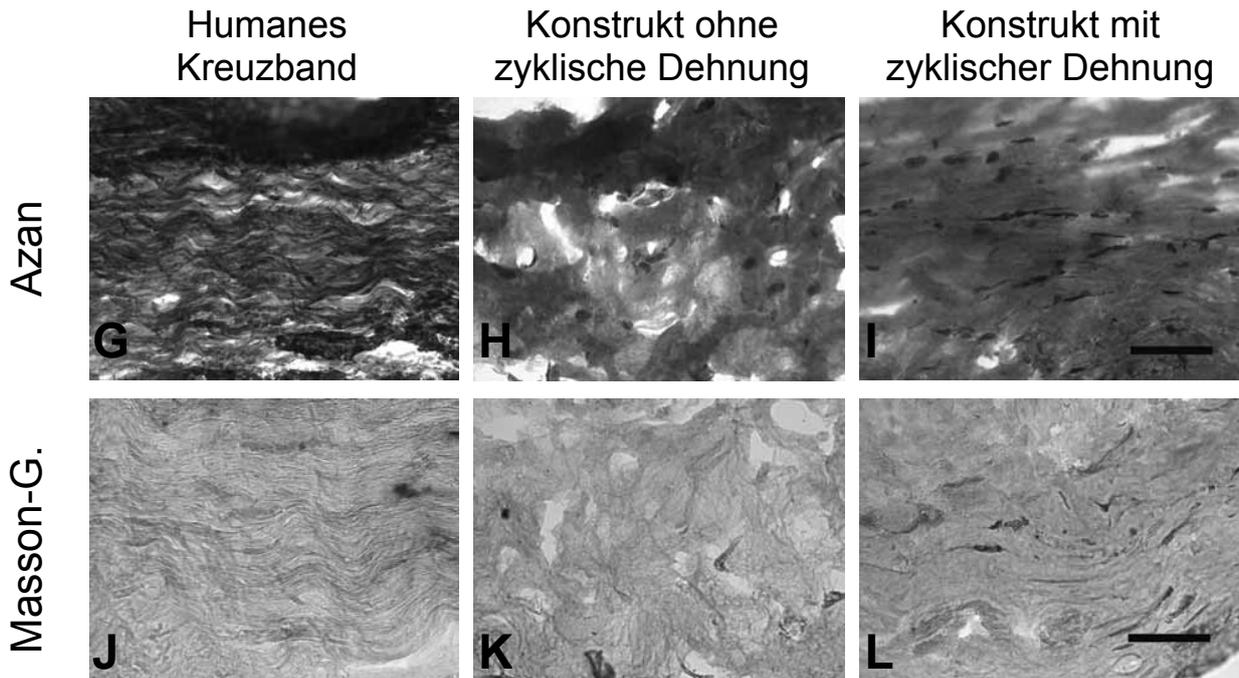
### 3.3 Einfluss von zyklischer Dehnung auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die in statische und zyklische Dehnungsgruppen eingeteilten Kreuzbandkonstrukte wurden miteinander verglichen, um zu ermitteln, ob zyklische Dehnung einen positiven Effekt auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix hat. Beide Konstruktgruppen wurden histochemisch und immunhistochemisch untersucht und die Genexpression mittels RT-PCR analysiert. Für beide Gruppen wurde der Versuch dreimal mit MSCs verschiedener Spender durchgeführt.

#### 3.3.1 Histochemische Färbungen



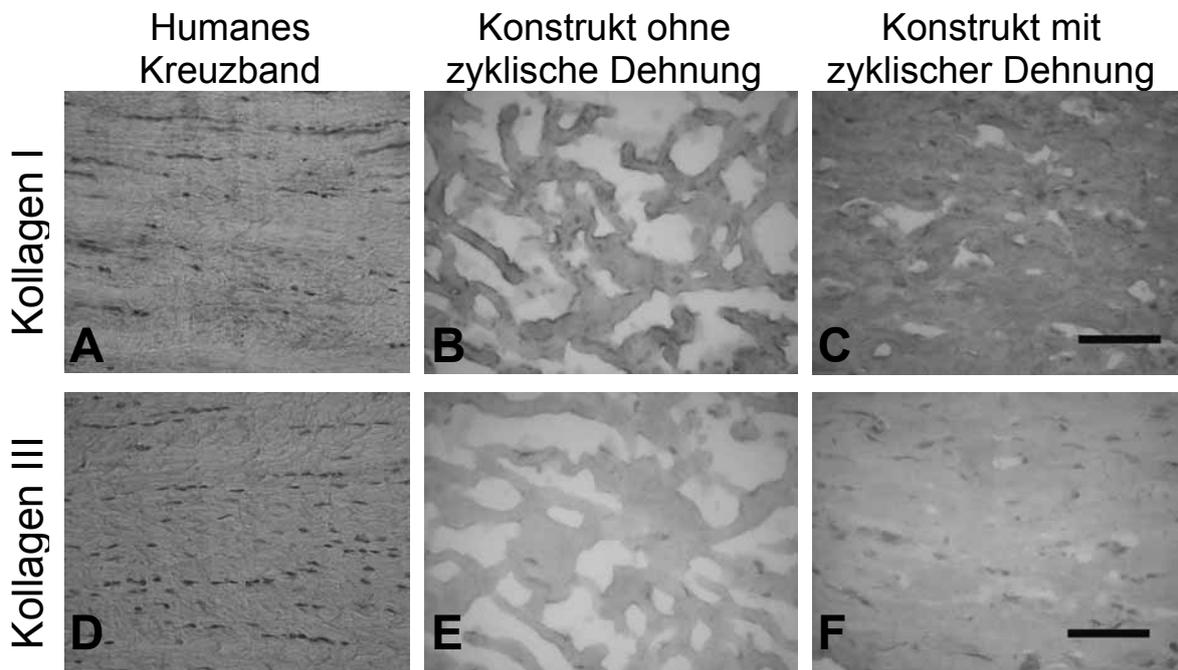
**Abb. 6 A - F:** Vergleich histochemischer Färbungen eines humanen vorderen Kreuzbandes, eines Kreuzbandkonstruktes ohne zyklische Dehnung und eines Kreuzbandkonstruktes nach zyklischer Dehnung im Bioreaktor für 2 Wochen. Es wurden H/E- (A - C) und Sirius-red-Färbungen (D - F) durchgeführt. Balken 100 µm.



**Abb. 6 G - L:** Vergleich histochemischer Färbungen eines humanen vorderen Kreuzbandes, eines Kreuzbandkonstruktes ohne zyklische Dehnung und eines Kreuzbandkonstruktes nach zyklischer Dehnung im Bioreaktor für 2 Wochen. Es wurden Azan- (G - I), und Masson-Goldner-Färbungen (J - L) durchgeführt. Balken 100 µm.

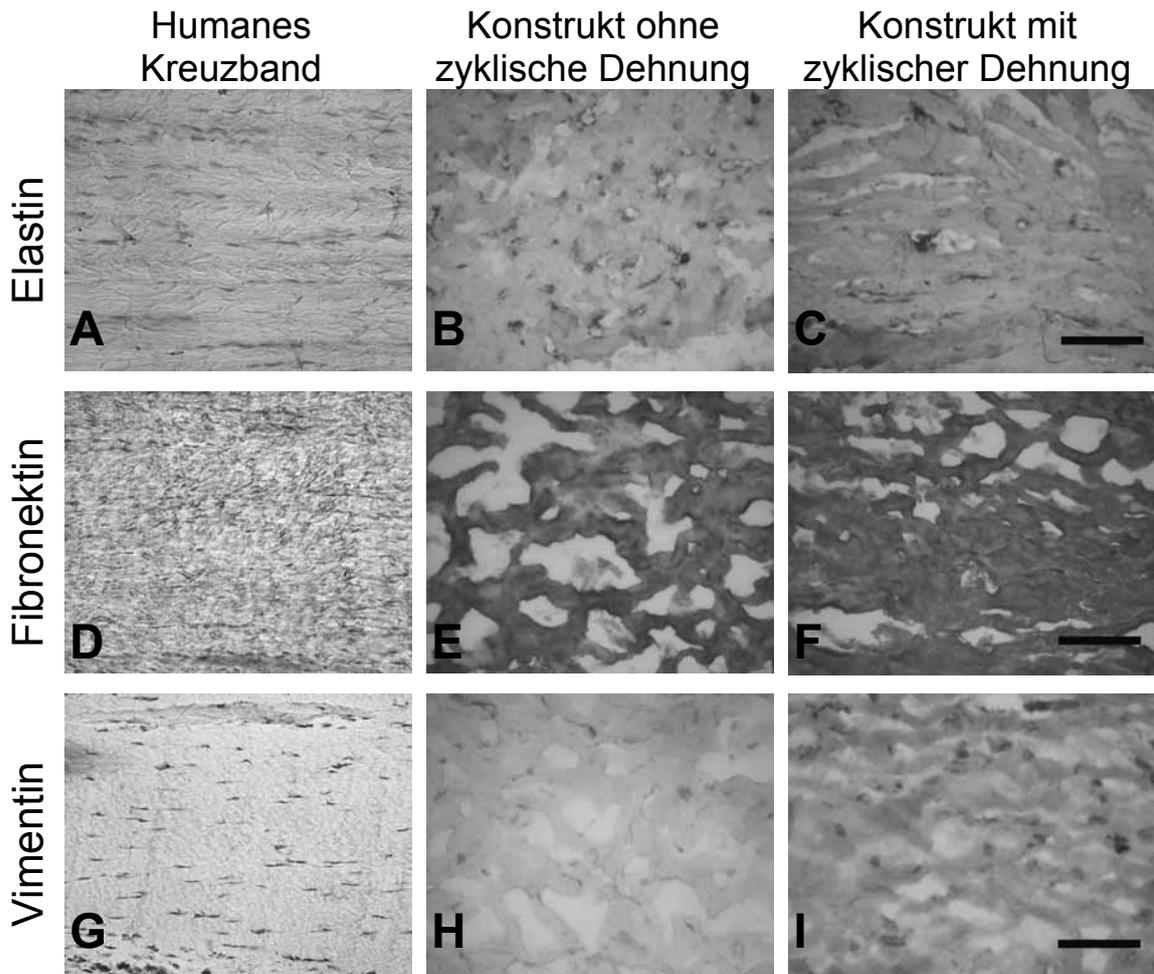
Im Vergleich der beiden Kreuzbandkonstrukte zeigte sich bei dem Konstrukt mit zyklischer Dehnung eine deutlich dichtere extrazelluläre Matrix. Die Zellen waren spindelförmig entlang der Zugrichtung ausgerichtet (Abb. 6C, F, I, L). Die Zellkerne der gedehnten Konstrukte waren leicht elongiert. Das kollagene Bindegewebe ist, wie beim humanen Kreuzband, wellenförmig in Zugrichtung ausgerichtet. Dies war besonders in der Masson-Goldner-Trichromfärbung, einer Färbung zur differenzierten Darstellung von Kollagenfibrillen, und in der Azanfärbung, in der besonders kollagenes und retikuläres Bindegewebe angefärbt wird, zu erkennen. Bei den ungedehnten Kontroll-Konstrukten konnten keine der oben genannten Merkmale im Hinblick auf den Aufbau eines humanen Kreuzbandes festgestellt werden. Das Gewebe wirkte stark aufgelockert, die kollagenen Fasern lagen diffus verteilt ohne organisierte parallele Ausrichtung im Konstrukt vor.

### 3.3.2 Immunhistochemische Färbungen



**Abb. 7 A - F:** Immunhistochemische Färbungen für Kollagen I und Kollagen III eines humanen vorderen Kreuzbandes (A, D), eines Kreuzbandkonstruktes ohne Dehnung (B, E) und eines Kreuzbandkonstruktes mit Dehnung im Bioreaktor für 2 Wochen (C, F). Balken 100  $\mu\text{m}$ .

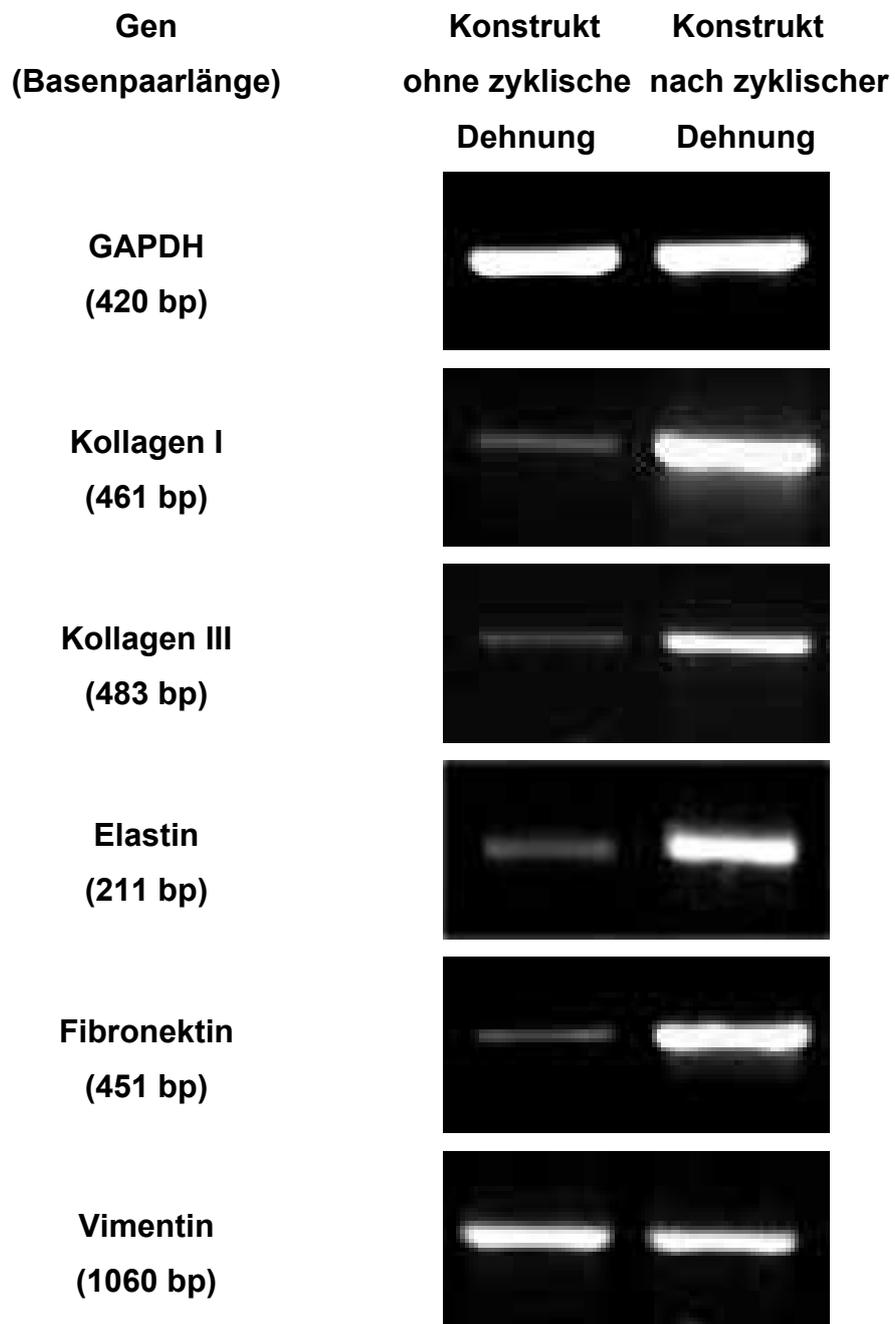
Beim Vergleich der Kreuzbandkonstrukte zeigte sich eine intensivere Färbung in der gedehnten Gruppe und somit eine stärkere Expression von Kollagen I und III (Abb. 7 A - F). Das gedehnte Band wurde durch die vermehrte Produktion von Matrix durch stimulierte Zellen verdichtet. Eine leicht wellenförmige Ausrichtung der Kollagenfasern in Zugrichtung war ebenfalls zu erkennen. Die gedehnte Gruppe enthielt eine höhere Anzahl spindelförmiger Zellen, deren Zellkerne sich elongiert darstellten. Die ungedehnten Kontrollkonstrukte waren schwächer angefärbt, was auf eine geringere Expression von Kollagen I und III hindeutet. Das Gewebe wirkte aufgelockert, die Kollagenfasern lagen diffus verteilt ohne organisierte Ausrichtung im Konstrukt vor.



**Abb. 8 A - I:** Immunhistochemische Färbungen für Elastin (A - C), Fibronektin (D - F) und Vimentin (G - I) eines humanen vorderen Kreuzbandes, eines Kreuzbandkonstruktes ohne Dehnung und eines Kreuzbandkonstruktes mit Dehnung im Bioreaktor für 2 Wochen. Balken 100 µm.

Die Expression von Elastin und Vimentin war, durch die intensivere Färbung erkennbar, in der gedehnten Gruppe ebenfalls erhöht, während für Fibronektin keine höhere Expression zu erkennen war. Eine stärkere Matrixproduktion des Konstruktes mit zyklischer Dehnung im Vergleich zu dem Konstrukt ohne zyklische Dehnung war aber auch hier in allen Färbungen festzustellen (Abb. 8 A - I).

### 3.3.3 RT-PCR



**Abb. 9:** RT-PCR-Analysen für die Genexpression von Kollagen I, Kollagen III, Elastin, Fibronectin und Vimentin von Kreuzbandkonstrukten ohne zyklische Dehnung verglichen mit Kreuzbandkonstrukten mit zyklischer Dehnung für 2 Wochen. GAPDH wurde als House-keeping-Gen verwendet.

Die RT-PCR zeigte in der Konstruktgruppe mit zyklischer Dehnung eine deutlich höhere Expression von Kollagen I, Kollagen III, Elastin und Fibronectin als in der Konstruktgruppe ohne zyklische Dehnung. Für Vimentin war keine Expressionserhöhung in der gedehnten Gruppe sichtbar (Abb. 9).

## 4 Diskussion

### 4.1 Wahl des Trägermaterials

Der Einsatz unterschiedlicher Trägermaterialien zur Rekonstruktion von verletztem Weichteil- und Knochengewebe hat in den letzten Jahren für die zellbasierte Therapie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Art des Trägermaterials wird jedoch kontrovers diskutiert.

Kollagen ist der Hauptbestandteil des gesunden vorderen Kreuzbandes, wie auch der extrazellulären Matrix an sich (Amiel et al., 1984). Als bioresorbierbares, natürliches Material, das eine Umwandlung des Gewebes erlaubt und in vivo durch neues Kollagengewebe ersetzt wird, ist Kollagen eine ideale Trägermatrix für den Ersatz eines rupturierten Kreuzbandes mit Zellen (Gentleman et al., 2003). Es eignet sich sehr gut für die Zellkultur aller Zelltypen und Gewebe und dient dort der Erhaltung des Proliferations-, Differenzierungs-, und Physiologiestatus der Zellen. Kollagen wird, vor allem nach seiner erfolgreichen Anwendung bei der Substitution von Haut, als eines der Biomaterialien mit den meisten Einsatzmöglichkeiten angesehen (Lee et al., 2001). Badylak et al. (1999) sehen natürlich vorkommende extrazelluläre Matrix als den Goldstandard für die Herstellung von Scaffolds zur Geweberekonstruktion. Sie ersetzten das vordere Kreuzband erfolgreich durch ein Stück Submukosa des Dünndarms, das ebenfalls zu mehr als 90 % aus Kollagen besteht (Hodde et al., 1996). Huang et al. (1993) und Goulet et al. (1997) versuchten eine Rekonstruktion des Bandes mit in Kollagengel gegossenen Fibroblasten. Sie erhielten Bandgewebe-ähnliche Strukturen, deren Hauptdefizit in der mangelnden Zugfestigkeit des Konstruktes lag. Trotz noch zu verbessernder Eigenschaften wird Kollagen auch hier als Matrix der Wahl angesehen. Auch Dunn et al. (1995) und Bellincampi et al. (1998) stellten einen Kreuzbandersatz aus mit Fibroblasten besiedelten Kollagenscaffolds her. Sie fanden heraus, dass Zellen auf Kollagenkonstrukten nach Implantation in vivo überleben und das Potential haben, das Remodeling eines Neo-Bandes unter anderem durch die verbesserte Kollagensynthese in dreidimensionalen Matrices zu beeinflussen und zu unterstützen.

Eine weitere Möglichkeit zur Rekonstruktion eines verletzten Kreuzbandes ist der Einsatz von synthetischen, biodegradierbaren Materialien. Fasern aus Polylactic Acid (PLA), Polyglycolic Acid (PGA) oder Kopolymere haben das Potential, als gutes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Scaffolds für das Tissue Engineering zu dienen (Freed et al., 1993; Vacanti et al., 1991; Cao et al., 1994). Laurencin et al. (1998) untersuchten den Einsatz von PLGA-Matrices als Trägermaterial für Fibroblasten zum Ersatz eines verletzten Bandes. Ein Kreuzbandkonstrukt aus Fibroblasten auf PGA-Scaffolds erforschten Ibarra et al. (1996) und Lin et al. (1999). Synthetische Materialien stellten sich bei beiden Arbeiten als stabile Trägersubstanzen für den Einsatz als Rekonstruktionsmaterial heraus. Van Eijk et al. (2004) untersuchten das Wachstumsverhalten verschiedener Zellarten auf Polylactid-Multifilamenten. Sie bestätigten in ihrer Arbeit ein gutes Wachstum der MSCs und eine früh beginnende Produktion von extrazellulärer Matrix auf biodegradierbaren Konstruktmaterialien.

Seidenfasern als ein erst langfristig resorbierbares Material setzten Altman et al. (2002a) für ihre Rekonstruktionsversuche ein und erzielten damit gute Ergebnisse, vor allem hinsichtlich der Zugfestigkeit des Konstrukts.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde bisher eine große Auswahl an Materialien zum Ersatz eines Kreuzbandes untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde Kollagen verwendet, da es als natürliche Grundstruktur aller Bänder ideale Voraussetzungen für den Einsatz als Trägersubstanz bietet. Es ist biokompatibel, biodegradierbar, stabil genug, um mechanischen Belastungen standhalten zu können, und löst nach Implantation allenfalls eine geringe Immunantwort aus.

Zuerst sollte das bovine Kollagen-I-Pulver der Firma Sigma, das auch in der Arbeit von Goulet et al. (1997 und 2000) für deren Scaffold beschrieben wurde, verwendet werden. Versuche, dieses Kollagengel zur Herstellung eines Kreuzbandkonstruktes zu nutzen, scheiterten an der mangelhaften Aushärtung der Gelsuspension, was das Gießen eines Konstruktes unmöglich machte. Aufgrund der Probleme mit der Herstellung des Gels wurde ein Kollagen Typ I-Hydrogel der Firma Ars Arthro, das aus Rattenschwänzen isoliert wurde, verwendet. Dieses Kollagen wird seit 2 Jahren für die klinische Implantation von

autologen Chondrozytentransplantaten verwendet (Schneider et al., 2003). Bei eigenen Voruntersuchungen wiesen die Zellen im Gel ein ideales Proliferationsverhalten auf. Bei Experimenten, Kreuzbandkonstrukte aus diesem Kollagen anzufertigen, zeigte sich, dass sich das Gel gut mit der Zellsuspension mischen ließ und ausreichend aushärtete, um ein stabiles ACL-Konstrukt in vitro herzustellen.

Für den Einsatz des Kollagenscaffolds in vivo reichte die Zugfestigkeit jedoch nicht aus. Ein humanes vorderes Kreuzband muss nach Sakane et al. (1997) bei normalen Bewegungen Kräften um die 111 N standhalten können. Bessette et al. (1990) beschrieben Normallasten um etwa 169 N. Zugkräfte, die das Band zum Reißen bringen, werden mit ungefähr 1730 N angegeben. Deshalb wird angestrebt, die Festigkeit des Kollagengels durch das Einarbeiten von stabilen Materialien zu verbessern. Es laufen bereits Studien, die den Einsatz von Hybridkonstrukten aus Kollagen Typ I-Hydrogel und Silikat- oder Kollagenfasern testen, um ein belastbares Konstrukt zu erhalten.

#### **4.2 Vergleich von ACL-Fibroblasten und MSCs aus dem Knochenmark**

Prinzipiell haben Fibroblasten des vorderen Kreuzbandes und Stammzellen aus dem Knochenmark denselben Ursprung, sie sind beide mesenchymale Zellen. Auch morphologisch waren zwischen ihnen keine nennenswerten Unterschiede feststellbar, beide weisen einen fibroblastären, spindelförmigen Phänotypen auf. Für beide Zelltypen sind jedoch spezifische und unspezifische Marker bekannt.

Fibroblasten aus dem Kreuzband exprimieren als typische Bandzellen Kollagen I, III und Fibronectin (Amiel et al., 1986). Kollagen I und III werden bei den meisten Arbeiten über Bänder und Sehnen als Marker benutzt (Goulet et al., 1997; Toyoda et al., 1998). Tenascin-C als typischer Marker für Bandzellen wird von Mackie et al. (1996) beschrieben. Ciquet-Ehrismann et al. (1994) setzten ihn als Fibroblastenmarker bei Versuchen zum Nachweis der Wirkung von mechanischem Stress auf Fibroblasten im Kollagengel ein. Nach Goulet et al. (1997) werden ebenfalls Elastin und Vimentin als wichtige, aber unspezifische Proteine exprimiert. Unsere Arbeitsgruppe verwendete Kollagen I, III,

Fibronectin, Elastin und Vimentin zum Nachweis vorhandener Proteine und deren Expression.

Humane Stammzellen aus dem Knochenmark repräsentieren eine phänotypisch fast identische Zellpopulation. Sie sind nahezu einheitlich positiv für die Oberflächenantigene SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 und STRO-1. Sie sind dagegen negativ für einige Marker der hämatopoetischen Zelllinie, wie CD14 und CD34 als Antigene des Lipopolysaccharidrezeptors und das Leukozytenantigen CD45 (Pittenger et al., 1999). Jones et al. fanden 2002 weitere Oberflächenmerkmale heraus. MSCs sind nach dieser Forschergruppe außerdem positiv für die Antigene CD10, CD13, CD105, HLA-DR und negativ für CD117 und CD133. Altman et al. (2002b) verwendeten in ihren Arbeiten zur Färbung und RT-PCR ihrer aus mesenchymalen Stammzellen und Kollagen I hergestellten Bandkonstrukte Kollagen I, III, Fibronectin und Tenascin-C als Marker.

Eine direkt vergleichende Immunhistochemie der beiden Zelltypen ist in der Literatur jedoch nicht beschrieben. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit ACL-Fibroblasten und Knochenmarkstammzellen miteinander verglichen, bevor Stammzellen zur Herstellung von Kreuzbandkonstrukten verwendet wurden. Das Ziel lag darin festzustellen, inwieweit Stammzellen als Ausgangszellen Fibroblastenmarker exprimieren.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Expressionsmuster der beiden Zelltypen gleich war. Sowohl in immunhistochemischen Färbungen als auch in der RT-PCR waren die Zellen für die gewählten Fibroblastenmarker Kollagen I, III, Elastin, Fibronectin und Vimentin positiv. MSCs können deshalb gut anstelle von ACL-Fibroblasten als Zellmaterial zur Rekonstruktion von rupturierten Kreuzbändern eingesetzt werden. Obwohl die Forschung mit auf Zelltherapie basierenden Verfahren zur Behandlung von Kreuzbandverletzungen noch in den Anfängen steckt, scheint die Therapie mit MSCs am sehr erfolgversprechend zu sein (Woo et al., 1999).

## **4.3 Herstellung des Kreuzbandkonstruktes**

### **4.3.1 Entwurf des Bioreaktors**

Um ein stabiles Bandkonstrukt für eine spätere Verwendung zur Rekonstruktion von rupturierten Kreuzbändern zu erhalten, wurde der Ansatz verfolgt, die mechanischen Eigenschaften des Bandes durch Stimulation zu verbessern. Schon 1980 konnte von Buck gezeigt werden, dass externe Zugkräfte die räumliche Orientierung von Zellen beeinflussen. Amiel et al. stellten 1984 fest, dass das Remodeling von Bändern entscheidend von den mechanischen Kräften abhängt, die auf das Band einwirken. Auch die biomechanischen Eigenschaften von Bandäquivalenten verändern sich unter dem Einfluss von mechanischer Dehnung. Für die Stimulation der Bänder wurde somit ein Bioreaktor benötigt. In Kooperation mit Prof. Dr.-Ing. Thull (Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg) wurde speziell für die vorliegende Arbeit ein Bioreaktor für die zyklische Dehnung der hergestellten Kreuzbandkonstrukte entworfen und gebaut. Damit die Zellen in der Matrix überleben konnten, musste der Bioreaktor mit den atmosphärischen Gegebenheiten der Zellkultur von 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung vereinbar sein und einen Gasaustausch über Filter ermöglichen. Das Konstruktionsmaterial musste korrosionsstabil, leicht zu autoklavieren und biokompatibel sein. Außerdem musste das sterile Kompartiment des Bioreaktors leicht zu erreichen sein, um einen Einbau des Konstruktes und den Wechsel des Mediums zu erlauben. Langelier et al. (1999) konstruierten für die zyklische Dehnung eines mit Fibroblasten besiedelten Kollagengels einen Bioreaktor, der die oben genannten Forderungen erfüllte. Über Knochenenden konnte das Fibroblastengel in der Testkammer befestigt und horizontal gedehnt werden. Weiss et al. (2001) setzten in ihrer Arbeit zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von vaskularisierten Kollagengelen ebenfalls einen Bioreaktor ein. Die Gele waren über Stahlanker, einer davon auf einer Seite der Testkammer fest verankert, der andere frei beweglich, mit dem zugausübenden Motor verbunden und wurden so horizontal gedehnt. Altman et al. (2002a) konstruierten für ihre Arbeit einen Reaktor, in dem bis zu 12 Kollagenkonstrukte

gleichzeitig kultiviert werden konnten. Die Bänder wurden (jeweils in eigenen Tubes) vertikal gedehnt und Rotationsstress ausgesetzt.

Das Stammzellkonstrukt der vorliegenden Arbeit wurde über endständige Knochenblöcke an Ankern in der Testkammer befestigt, von denen einer fest installiert und einer frei beweglich war. Über einen Stahlstab und eine nachfolgende Kraftübertragungsrolle war der Anker mit einem Motor verbunden. Das Konstrukt konnte so vertikal mit den am Gerät einstellbaren Geschwindigkeiten und Amplituden gedehnt werden. Leider war dieser Bioreaktor nur für ein Band ausgerichtet, so dass alle Versuche hintereinander laufen mussten. Die Konstruktion eines Reaktors mit mehreren Testkompartimenten, wie es bei Altman et al. (2002a) beschrieben ist, ist ein Ansatz, der bei nachfolgenden Versuchen verfolgt werden soll.

#### **4.3.2 Endständige Knochenblöcke als Verankerung**

Kollagengele allein können nur schwer in Bioreaktoren eingebaut werden, da sie, vor allem in den ersten Tagen nach der Polymerisation, sehr fragil sind und leicht zu reißen drohen. Auch die Ausübung von Kraft auf die Konstrukte ist ohne Ansatzmöglichkeit nur eingeschränkt möglich.

Bellows et al. (1982) gossen deshalb ihr Kollagengel mit Periodontal-Zellen zwischen zwei Zahn- und Knochenstücke, um die Möglichkeit zu haben, Zug auf die Zellen auszuüben. Bei Huang et al. (1993) wurden poröse Polyethylenblöcke in die Matrix eingegossen und das Konstrukt an diesen unter Zug gehalten.

Eine sichere Art der Verankerung von autologen Kreuzbandtransplantaten im Kniegelenk ist die bei der Patellarsehnenplastik angewandte Knochen-Sehnen-Knochen-Methode. Hierbei wird das mittlere Drittel der Patellarsehne mit einem Stück Tibia an der einen und einem Stück Patella an der anderen entnommen und statt des gerissenen Kreuzbandes eingesetzt. In Anlehnung an diese Technik ist das Einarbeiten von Knochenblöcken in Kollagengele die Methode der Wahl. Goulet et al. (1997 und 2000) benutzten endständige Knochenanker, die direkt von Beginn der Konstruktherstellung in die Bandstruktur integriert wurden zur Erleichterung einer eventuellen Versuchstransplantation in vivo.

Auch für später stattfindende ACL-Rekonstruktionen beim Menschen können sie von Nutzen sein. Von Altman et al. (2002a) wird ebenfalls der Einsatz von Knochenankern bei ihren Konstrukten beschrieben. Sie ermöglichen einen Einbau der Konstrukte in den Bioreaktor.

In den oben genannten Veröffentlichungen wurden keine Probleme mit dem Einbringen der Knochenblöcke oder anderer Ankerarten in ein Kollagengel beschrieben. Da bei erfolgreicher Herstellung eines zugfesten Konstruktes ein Einbau der Konstrukte in den Bioreaktor erleichtert würde und mit dieser Methode eine Implantation in vivo möglich wäre, wurden auch in der vorliegenden Arbeit demineralisierte Knochenblöcke in das Gel eingearbeitet.

#### **4.4 Mechanische Stimulation durch zyklische Dehnung**

Die Auswirkungen mechanischer Stimulation auf Genexpression und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix versucht man durch folgende Ursachen zu erklären: Mechanische Signale können an der Zelloberfläche spezifische Rezeptoren aktivieren, die über Signalkaskaden eine Genaktivierung induzieren und so zur Stimulation der Synthese und Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen führen (Toyoda et al., 1998). Zusätzlich wird diskutiert, dass auch eine Änderung des Flusses von Nährstoffen, Metaboliten und Sauerstoff durch das Konstrukt induziert wird. Durch die verbesserte Versorgungssituation könnten die Zellen zu vermehrter Proliferation und erhöhter Syntheseleistung angeregt werden.

Lin et al. (1999) nahmen diese Erklärungen als Grundlage für ihren Versuchsaufbau. Sie stimulierten Fibroblasten in Bandstrukturen aus PGA-Fasern durch mechanische Durchmischung des umgebenden Mediums. Das Ergebnis zeigte eine deutlich gesteigerte Proliferation der Fibroblasten unter Stimulation im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

Huang et al. (1993) untersuchten die Dynamik der Matrixkonsolidation und -stärke von humanen Fibroblasten der Haut in einem Kollagengel in vitro. Sie beobachteten eine uniaxiale Ausrichtung der Matrix, die histologisch der eines Bandes ähnelte. Mechanische Untersuchungen zeigten, dass die Reißfestigkeit

des Bandkonstruktes nach 12 Wochen Stimulation durch Dehnung um das 30-fache gegenüber einem ungedehnten Bandes angestiegen war.

Versuche zur Rekonstruktion von Sehndefekten mittels Konstrukten in vivo wurden am Tiermodell von Young et al. (1998) und Awad et al. (1999) durchgeführt.

Young et al. (1998) implantierten ein Kollagengelkonstrukt mit MSCs in einen ca. 1 cm langen Defekt in Achillessehnen von Kaninchen. Die Ergebnisse wurden nach 4, 8 und 12 Wochen ausgewertet und zeigten zu allen Zeitpunkten bessere Struktureigenschaften der MSC-Transplantate als der Kontrollgruppe, in der nur ein Scaffold ohne Zellen eingesetzt wurde. Die zyklische Einwirkung, von der bei Versuchen an Tieren in vivo ausgegangen werden kann, führte zu einer parallelen Anordnung der Kollagenfasern und einer longitudinalen Ausrichtung der Zellen. Analoge Versuche wurden von Awad et al. (1999) durchgeführt, die MSCs in Kollagengel in kleine Defekte der Patellarsehnen von Kaninchen einsetzten. Bei beiden Versuchsaufbauten wurden die Tiere nicht mit einem Gips oder ähnlichem ruhiggestellt, wodurch eine physiologische Dehnung der implantierten Zellen bzw. Konstrukte erfolgte. Durch die Zugbelastung in Kombination mit dem Einsatz von Stammzellen kam es zu einer signifikant besseren Heilung der Sehne als bei den Kontrollkonstrukten ohne Zellen. Awad et al. fanden eine deutliche Ausbildung von Kollagenfaserbündeln in den Zellkonstrukten, eine Ausrichtung der Zellkerne konnten sie jedoch nicht feststellen. Diese Ergebnisse können laut Woo et al. (1999) auch als Basis für den Einsatz von MSCs zur Bandrekonstruktion übernommen werden.

Goulet et al. (1997 und 2000) unterzogen ihre Kollagengele mit ACL-Fibroblasten in vitro einer mechanischen Zugstimulation für 10 Tage. Sie stellten fest, dass lebende Zellen im ACL-Konstrukt auf mechanische Stimulation in vitro reagieren können, da sie bei ihren Versuchen eine Stimulation der Kollagensekretion und eine Matrixumwandlung fanden. Histologische Färbungen zeigten unter zyklischem Stress eine Umwandlung der Kollagenfasern in dicke Kollagenbündel mit wellenförmiger Struktur und eine Ausrichtung der Fasern in der Zugachse.

Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Arbeit von Altman et al. (2002). Sie besiedelten Kollagengele mit bovinen und humanen Stammzellen aus dem Knochenmark und setzten diese 21 Tage mechanischem Zug- und Rotationsstress aus. Sie beobachteten bei den gedehnten Konstrukten helikal organisierte Kollagenfasern, die sich in Richtung des Zuges ausgerichtet hatten. Außerdem bewirkte die mechanische Stimulation im Vergleich zu den statischen Bandäquivalenten eine 2,5 mal so große Elongation der Zellen in Richtung des Zuges. Immunhistochemische Färbungen wiesen ein Vorkommen von Kollagen I, III und Fibronectin in den gedehnten Konstrukten, aber nicht in den Kontrollen nach. Real-time RT-PCR-Analysen zeigten eine höhere Expression von Kollagen I, III und Tenascin-C in der Dehnungsgruppe.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten in der RT-PCR ebenfalls eine deutlich höhere Expression von Kollagen I, III und Fibronectin der Konstrukte unter zyklischer Dehnung im Bioreaktor im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den immunhistochemischen Färbungen stellte sich jedoch ein Vorhandensein der untersuchten Marker sowohl in der extrazellulären Matrix der gedehnten Gruppe als auch in der Matrix der Kontrollgruppe dar. Allerdings waren Kollagen I, III, Elastin und Vimentin in den Zugkonstrukten deutlich vermehrt exprimiert. Bindegewebsfärbungen, wie Azan oder Masson-Goldner, zeigten eine starke Verdichtung der Matrix der Dehnungsgruppe durch die gesteigerte Syntheseleistung der stimulierten Zellen. Die kollagenen Bindegewebsfasern waren, wie schon bei Altman et al. (2002b) und Goulet et al. (1997 und 2000) beschrieben, in Zugrichtung ausgerichtet. Die Zellkerne der gedehnten Konstrukte stellten sich im Gegensatz zu den runden Kernen der Kontrollgruppe in Faserrichtung leicht elongiert dar.

Trotz dieser deutlichen Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung von mechanischem Stress auf Kollagen-Zell-Konstrukte sind jedoch weitere Forschungen notwendig. Insbesondere mit der Frage, inwieweit unterschiedliche Stimulationsart, -dauer und -stärke die Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von solchen Konstrukten beeinflussen, müssen sich diese befassen. Es ist von großem Interesse, welche weiteren Gene, neben den bekannten und oben beschriebenen Markern, außerdem durch die

zyklische Dehnung der Scaffolds heraufreguliert werden. Hierzu sind Studien geplant, die die genaue Molekularbiologie der MSC-Konstrukte durch Analysen mittels Mikroarrays untersuchen.

#### **4.5 Einsatz von Wachstumsfaktoren**

Weitere Einflussmöglichkeiten auf die Proliferation von MSCs, die Differenzierung zu Fibroblasten und die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Zell-Kollagen-Konstrukte eröffnen sich durch die Verwendung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- $\beta$ 1, EGF, PDGF oder bFGF. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Verwendung von Wachstumsfaktoren verzichtet, da zunächst die Grundlagen der Konstruktherstellung, das Wachstum der Zellen auf der Basis von Fibroblastenkulturmedium und der Einfluss der zyklischen Dehnung untersucht werden sollten. In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze zur Verwendung von Wachstumsfaktoren bei der Erforschung des Wachstums von ACL-Fibroblasten und der Heilung von Verletzungen des vorderen Kreuzbandes.

Lee et al. (1998) stellten fest, dass 7 Tage nach einer Verletzung des Kreuzbandes bei Kaninchen die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- $\beta$ 1 und bFGF im Bereich der Wunde leicht erhöht waren. Ihre genaue Rolle bei der Wundheilung ist noch nicht gänzlich geklärt, bei PDGF geht man jedoch davon aus, dass durch seine mitogenen und chemotaktischen Eigenschaften der Zellgehalt im verletzten Gebiet ansteigt. Meaney Murray et al. (2003) untersuchten die Rolle von TGF- $\beta$ 1, PDGF und FGF-2 bei der Reparatur eines rupturierten vorderen Kreuzbandes mittels Kollagen-Glykosaminoglykan-Scaffolds. Die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 und PDGF zum Zellkulturmedium erhöhte die Zellzahl und die Kollagenproduktion im Scaffold, FGF-2 erhöhte ebenfalls die Zellzahl und verhinderte ein Zusammenschrumpfen des Reparaturmaterials. Man kann vermuten, dass eine Zugabe entsprechender Wachstumsfaktoren bei der Heilung eines rupturierten Kreuzbandes mittels eines Scaffolds zwischen den Kreuzbandenden und eventuell auch bei der Herstellung eines Kreuzbandkonstruktes mit integrierten Zellen hilfreich sein könnte.

Kim et al. (2002) fanden heraus, dass durch mechanischen Stress neben einer Erhöhung der mRNA-Expression von Typ I- und III-Kollagen auch der Gehalt an TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturmedium anstieg. In weiteren Untersuchungen konnte bei Zugabe von TGF- $\beta$ 1-Antikörpern kein Anstieg des Typ I- und III-Kollagengehaltes festgestellt werden. Die Untersucher gingen davon aus, dass bei zyklischem Stretching über autokrine Mechanismen TGF- $\beta$ 1 ausgeschüttet wurde und so die oben genannten Veränderungen bewirkte. Der Zeitpunkt der Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Medium und die Dosis der Faktoren scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen. Während Amiel et al. (1995) bei Kaninchen nach 48 Stunden keinen signifikanten Effekt von FGF-b und TGF- $\beta$ 1 auf die Proliferation von ACL-Fibroblasten und MSCs fanden, stellten Azuma et al. (2003) bei ihren Untersuchungen Veränderungen fest. Bei in vivo Versuchen an mit flüssigem Sauerstoff geschädigten Kaninchenkreuzbändern fügten sie nach jeweils 3 und 6 Wochen bei einer Gruppe nur Fibrin-Kleber, bei der zweiten Gruppe Fibrin-Kleber mit TGF- $\beta$ 1 und EGF hinzu. Nach zwölf Wochen wurden die Kreuzbänder untersucht und festgestellt, dass bei Zugabe von Wachstumsfaktoren nach 3 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein vermehrter Wassergehalt und eine Zunahme des Querschnitts verhindert und der Zugwiderstand der Kreuzbänder vergrößert wurde. Bei Zugabe der Wachstumsfaktoren 6 Wochen nach Schädigung konnten keine signifikanten Änderungen im Vergleich zum Kreuzband ohne besondere Behandlung nachgewiesen werden. Sakai et al. (2002) stellten bei einer ähnlich aufgebauten Studie mit Kaninchenkreuzbändern fest, dass nur eine niedrige Dosis an TGF- $\beta$ 1 und EGF die bei Azuma genannten Veränderungen bewirken konnte, während eine hohe Dosis der Wachstumsfaktoren keinen positiven Einfluss hatte.

In weiteren Untersuchungen bezüglich des Einsatzes von Wachstumsfaktoren bei der Herstellung eines Kreuzbandkonstruktes zur späteren Implantation in vivo müsste überprüft werden, welche Wachstumsfaktoren positive Effekte hinsichtlich Zellzahl, Produktion von Matrix, Ausrichtung der Fasern im Bandverlauf und letztendlich Zugfestigkeit des Konstruktes bringen könnten.

Außerdem sind Untersuchungen nötig, die die genaue Dosis, den Zeitpunkt und die Art der Zugabe der Faktoren analysieren.

## 5 Zusammenfassung

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes ist eine der häufigsten Verletzungen des Bandapparates beim Menschen. Neben der Einschränkung der Gesundheit des Betroffenen bringt diese Verletzung mit steigender Inzidenz auch eine gewaltige sozioökonomische Problematik mit sich. Da das Kreuzband, im Gegensatz zu einigen anderen Bändern, über ein mangelndes intrinsisches Heilungspotential verfügt, ist die chirurgische Rekonstruktion heute immer die Behandlungsmethode der Wahl. Patellarsehnen- und Semitendinosussehnentransplantate zeigen bisher die besten klinischen Ergebnisse. Durch ihre Entnahme und ihr Fehlen als motorische Einheit bringt dies eine gewisse Morbidität mit sich. Deshalb ist man heute auf der Suche nach alternativen Methoden für die Versorgung einer Kreuzbandruptur. Tissue Engineering als interdisziplinäres Forschungskonzept bietet vielfältige Möglichkeiten, die Funktion verschiedenster Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern. Insbesondere mesenchymale Stammzellen besitzen ein großes Potential für die Rekonstruktion von defektem Gewebe des Bewegungsapparates. Beispiele hierfür sind erste klinische Erfolge der Rekonstruktion von Knochengewebe.

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob es möglich ist, ein ACL-Konstrukt aus MSCs und Kollagen Typ I-Hydrogel herzustellen. Außerdem sollte die Auswirkung von mechanischem Stress auf Struktur und Eigenschaften eines solchen Bandäquivalentes untersucht werden.

Zunächst wurden Zellen aus dem vorderen Kreuzband und MSCs aus dem Knochenmark hinsichtlich Morphologie, Immunhistochemie und RT-PCR miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass beide Zelltypen in der primären Zellkultur die gleichen fibroblastären Marker exprimieren. Kollagen I, III, Elastin, Fibronectin und Vimentin sind bei beiden Zellarten in identischer Ausprägung zu finden. Stammzellen, die leicht zu isolieren und kultivieren sind, stellen als mesenchymale Zellen mit fibroblastären Phänotyp eine gute Zellgrundlage zur Herstellung eines Kreuzbandkonstruktes dar.

Es gelang in dieser Arbeit, aus einem Kollagen Typ I-Hydrogel der Firma Ars Arthro AG, mesenchymalen Stammzellen und endständigen Knochenblöcken

ein der Ligamentum-patellae-Plastik ähnliches Knochen-Band-Knochen-Transplantat zu entwickeln. Speziell für die zyklische Dehnung dieses Band-äquivalentes wurde ein Bioreaktor entworfen, in dem das Konstrukt über die Knochenblöcke, die auch eine spätere Implantation in vivo erleichtern sollen, befestigt werden konnte. Nach 3 Wochen Stimulation wurden die MSC-Kollagen-Konstrukte aufbereitet und gedehnte mit ungedehnten Bändern verglichen. Histochemisch zeigte sich durch zyklische Dehnung eine deutliche Induktion der Matrixproduktion, die auch die Integration des Bandgewebes durch Remodeling bei späterem Einsatz in vivo verbessern könnte. Die Kollagenfasern der Konstrukte waren wellenförmig in der Achse des Zuges ausgerichtet, und die Zellkerne stellten sich elongiert dar. Immunhistochemische Färbungen und RT-PCR-Analysen zeigten ebenso eine deutlich vermehrte Expression der spezifischen Fibroblastenmarker. Welche Gene außerdem durch zyklische Dehnung der Stammzellen reguliert werden, müssen weiterführende molekularbiologische Analysen mittels Mikroarrays zeigen. Die gewonnenen Ergebnisse dienen als Grundlage für die Herstellung eines Kreuzbandkonstruktes mit einer Armierung zur Erhöhung der Reißfestigkeit mit dem langfristigen Ziel, ein in vitro hergestelltes Konstrukt aus Kollagengel und Stammzellen am Menschen zu implantieren.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aglietti P**, Buzzi R, D'Andria S, Zaccherotti G (1993) Patellofemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. Clin Orthop 288:195-204.

**Altman GH**, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL (2002a) Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials 23:4131-4141.

**Altman GH**, Horan RI, Martin I, Farhadi J, Stark PRH, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D (2002b) Cell differentiation by mechanical stress. FASEB J 10(2):270-2.

**Amiel D**, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W (1984) Tendons and ligaments: A morphological and biochemical comparison. J Orthop Res 1:257-265.

**Amiel D**, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH (1986) The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. J Orthop Res 4:162-172.

**Amiel D**, Nagineni CN, Choi SH, Lee J (1995) Intrinsic properties of ACL and MCL cells and their responses to growth factors. Med Sci Sports Exerc 27(6):844-51

**Arnoczky SP** (1983) Anatomy of the anterior cruciate ligament. Clin Orthop Relat Res 172:19-25.

**Arnoczky SP** (1985) Blood supply to the anterior cruciate ligament and supporting structures. Orthop Clin North Am 16:15-27.

**Awad HA**, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI (1999) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering* 5:267-277.

**Azuma H**, Yasuda K, Tohyama H, Sakai T, Majima T, Aoki Y, Minami A (2003) Timing of administration of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor influences the effect on material properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament. *J Biomech* 36(3):373-81.

**Badylak S**, Arnoczky S, Plouhar P, Haut R, Mendenhall V, Clarke R, Horvath C (1999) Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clin Orthop* 367S:333-343.

**Bell E**, Ehrlich P, Buttle DJ, Nakatsuji T (1981) Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent of full thickness. *Science* 221:1052-1054.

**Bellincampi LD**, Closkey RF, Prasad R, Zawadsky JP, Dunn MG (1998) Viability of fibroblast-seeded ligament analogs after autogenous implantation. *J Orthop Res* 16:414-420.

**Bellows CG**, Melcher AH, Aubin JE (1982) Association between tension and orientation of periodontal ligament fibroblasts and exogenous collagen fibres in collagen gels in vitro. *J Cell Sci* 58:125-138.

**Bessette GC**, Hunter RE (1990) The anterior cruciate ligament. *Orthopedics* 13:551-562.

**Bircher E** (1930) Über Kreuzbandverletzungen. *Zentralbl Chir* 57:2207.

**Bisceglie V** (1933) Über die antineoplastische Immunität: heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühnerembryonen. *Ztschr f Krebsforsch* 40:122-140.

**Bonamo J**, Krinick R, Sporn A (1984) Rupture of the patellar ligament after use of its central third for anterior cruciate reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* 66:1294-1297.

**Bosch U**, Krettek C (2002) Tissue Engineering von Sehnen- und Ligamentgewebe. *Unfallchirurg* 105:88-94.

**Brückner H** (1966) Eine neue Methode der Kreuzbandplastik. *Chirurg* 37:413-414.

**Burger C**, Prokop A, Andermahr J, Jubel A, Rehm Ke (2000) 100 Jahre Kreuzbandchirurgie: Die Beantwortung der wichtigsten Fragen in der Literatur der 90er Jahre. *Akt Traumatol* 30:73-87.

**Burke JF**, Yannas IV, Quimby WC, Bondoc CC, Jung WK (1981) Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 194:413-448.

**Butler DL**, Noyes FR, Grood ES (1980) Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. *J Bone Joint Surg Am* 62:259-270.

**Cao Y**, Vacanti JP, Ma X, Paige KT, Chowanski Z, Schloo B, Langer R, Vacanti CA (1994) Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes. *Transplantation Proc* 26:3390-3392.

**Caplan AI** (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-650

**Caplan AI**, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7:259-264.

**Carlstedt CA**, Nordin M (1989) Biomechanics of tendons and ligaments. Basic biomechanics of the musculoskeletal system, ed. Nordin M, Frankel VH, pp. 59-74, Lea & Febiger Verlag.

**Chen C**, Chen W, Shih C (1999) Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon-patellar bone autograft. *J Trauma* 46:678-682.

**Chiquet-Ehrismann R**, Tannheimer M, Koch M, Brunner A, Spring J, Martin D, Baumgartner S, Chiquet M (1994) Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol* 127:2093-2101.

**Comley A**, Krishnan J (1999) Donor site morbidity after quadriceps tendon harvest for rotator cuff repair. *Aust NZ J Surg* 69:808-810.

**Dunn MG**, Liesch JB, Tiku ML, Zawadsky JP (1995) Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J Biomed Mater Res* 29:1363-1371.

**Dunn MG** (1998) Anterior cruciate ligament prostheses, *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*, ed. Fahey TD.

**Eberhardt C**, Jäger A, Schwetlick G, Rauschmann MA (2002) zum thema: vorderes Kreuzband: Geschichte der Chirurgie des vorderen Kreuzbandes. *Orthopäde* 31:702-709.

**Freed LE**, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R (1993) Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 27:11.

**Fuchs JR**, Nasser BA, Vacanti JP (2001) Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 72 :577-591.

**Gentleman E**, Lay AN, Dickerson DA, Nauman EA, Livesay GA, Dee KC (2003) Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 24:3805-3813.

**Goulet F**, Germain L, Rancourt D, Caron C, Normand A, Auger FA (1997) Tendons and ligaments. *Principles of Tissue engineering*, ed. Lanza RP, Langer R, Chick WL, pp 632-644, R.G. Landes Company.

**Goulet F**, Rancourt D, Cloutier R, Germain L, Poole AR, Auger FA (2000) Tendons and ligaments. *Principles of Tissue Engineering Second Edition*, ed. Lanza RP, Langer R, Chick WL, pp 711-722, Academic Press.

**Grood ES**, Noyes FR, Butler DL, Suntay WL (1981) Ligamentous and capsular restraints preventing straight medial and lateral laxity in intact human cadaver knee. *J Bone Joint Surg Am* 70:1257-1269.

**Grüber J**, Wolter D, Lierse W (1986) Der vordere Kreuzbandreflex (LCA-Reflex). *Unfallchirurg* 89:551-554.

**Halata Z**, Haus J (1989) The ultrastructure of sensory nerve endings in the human anterior cruciate ligament. *Anat Embryol* 179:415-421.

**Hamner D**, Brown C, Steiner M, Hecker A, Hayes W (1999) Hamstring tendon grafts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: Biomechanical evaluation of the use of multiple strands and tensioning techniques. *J Bone Joint Surg Am* 81:549-557.

**Hawkins R**, Misamore G, Merritt T (1986) Follow up of the acute nonoperated isolated anterior cruciate ligament tear. *Am J Sports Med* 14:205-210.

**Haynesworth SE**, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88.

- Hodde JP**, Badylak SF, Brightman AO, Voytik-Harbin SL (1996) Glycosaminoglycan content of the small intestinal submucosa: A bioscaffold for tissue replacement. *Tissue Eng* 2:209-217.
- Huard J**, Li Y, Peng H, Fu FH (2003) Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med* 5:93-108.
- Huang D**, Chang T, Aggarwal A, Lee R, Ehrlich H (1993) Mechanisms and dynamics of mechanical strengthening in ligament-equivalent fibroblast-populated collagen matrices. *Ann Biomed Eng* 21:289-305.
- Hungervorst T**, Brand RA (1998) Current concepts review: Mechanorezeptors in joint function. *J Bone Joint Surg Am* 80:1365-1378.
- Hunziker EB** (1990) Strukturmoleküle des Knorpelgewebes, der Sehnen und Bänder. *Kniesgelenk und Kreuzbänder: Anatomie, Biomechnik, Klinik, Rekonstruktion, Komplikationen, Rehabilitation*, ed. Jakob RP, Stäubli HU, pp 64-79, Springer Verlag.
- Ibarra C**, Cao Y, Kim TH (1996) Tissue engineering ligaments. *Surg Forum* 47:612-615.
- Jones EA**, Kinsley Se, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46:3349-3360.
- Jones KG** (1963) Reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 45:925-932.

**Kaplan N**, Wickiewicz TL, Warren RF (1990) Primary surgical treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A long-term follow-up study. *Am J Sports Med* 18:354-358.

**Kartus J**, Magnusson L, Stener S, Brandsson, Eriksson B, Karlsson J (1999) Complications following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction- A 2-5 year follow-up of 604 patients with special emphasis on anterior knee pain. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 7:2-8.

**Kim SG**, Akaike T, Sasagaw T, Atomi Y, Kurosawa H (2002) Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct* 27(3):139-44.

**Klein W**, Jensen Ku (1992) Synovitis and artificial ligaments. *Arthroscopy* 8:116-124.

**Knese KH**, Biermann H (1958) Die Knochenbildung an Sehnen- und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. *Z Zellforsch* 49:142-187.

**Kobayashi K**, Healey RM, Sah RL, Clark JJ, Tu BP, Goomer RS, Akeson WH, Moriya H, Amiel D (2000) Novel method for the quantitative assessment of cell migration: A study on the motility of rabbit anterior cruciate (ACL) and medial collateral ligament (MCL) cells. *Tissue Eng* 6:29-38.

**Langelier E**, Rancourt D, Bouchard S, Lord C, Stevens PP, Germain L, Auger FA (1999) Cyclic traction machine for long-term culture of fibroblast-populated collagen gels. *Ann Biomed Eng* 27:67-72.

**Langer R**, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920-926.

**Laurencin C**, Attawia M, Botchwey E, Warren R, Attia E (1998) Cell-material systems for anterior cruciate ligament regeneration. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34:90-92.

**Laurencin CT**, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA Jr. (1999) Tissue engineering: Orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1:19-46.

**Lee CH**, Singla A, Lee, Y (2001) Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 221:1-22.

**Lee J**, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D (1998) Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Iowa Orthop J* 18:19-25.

**Lin VS**, Lee MC, O`Neal S, McKean J, Sung KLP (1999) Ligament tissue engineering using synthetic biodegradable fiber scaffolds. *Tissue Eng* 5:443-451.

**Mackie EJ**, Ramsey S (1996) Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J Anatomy* 188:157-165.

**Marler JJ**, Upton J, Langer R, Vacanti JP (1998) Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 33:165-182.

**McCarrol J** (1983) Fracture of the patella during a golf swing following reconstruction of the anterior cruciate ligament: A case report. *Am J Sports Med* 11:26-27.

**Meaney Murray M**, Rice K, Wright RJ, Spector M (2003) The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold. *J Orthop Res* 21(2):238-44.

**Menetrey J**, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Fu FH, Moreland MS, Huard J (1999) Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng* 5:435-442.

**Nöth U**, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS (2002a) In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 8:131-143.

**Nöth U**, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002b) Multilineage differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20:1060-1069.

**Nöth U**, Hendrich C, Schütze N, Eulert J, Jakob F (2003) Tissue Engineering des muskuloskeletalen Systems mit humanen mesenchymalen Stammzellen. *Bioforum (Sonderausgabe/Zellbiologie)* 1:18-20.

**Odensten M**, Lysholm J, Gillquist J (1984) Suture of fresh ruptures of anterior cruciate ligament. A 5-year follow-up. *Acta Orthop Scand* 55:270-272.

**Odensten M**, Gillquist J (1985) Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* 67:257-262.

**O'Donoghue D**, Frank G, Jeter G, Johnson W, Zeiders J, Kenyon R (1971) Repair and reconstruction of the anterior cruciate ligament in dogs. Factors influencing long-term results. *J Bone Joint Surg Am* 53:710-718.

**Peterson W**, Tillmann B (1995) Die Insertionszone des vorderen Kreuzbandes. *Ann Anat* 257S:345.

**Peterson W**, Hansen U (1996) Blood supply of the anterior cruciate ligament. An immunohistochemical study in human cadavers. *J Orthop Sci* 5:332-334.

**Petersen W**, Tillmann B (2002) zum thema: vorderes Kreuzband: Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes. Orthopäde 31:710-718.

**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.

**Ritchie JR**, Parker RD (1996) Graft selection in anterior cruciate ligament revision surgery. Clin Orthop 325:65-77.

**Robson AW** (1903) Ruptured crucial ligaments and their repair by operation. Ann Surg 37:716-718.

**Rosenberg J**, Franklin J, Baldwin G, Nelson D (1990) Extensor mechanism morbidity associated with patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med 20:519-525.

**Rupp S**, Kohn D (2002) Vorderes Kreuzband im Mittelpunkt des Interesses. Orthopäde 31:701.

**Sakai T**, Yasuda K, Toyama H, Azuma H, Nagumo A, Majima T, Frank CB (2002) Effects of combined administration of transforming growth factor-beta 1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. J Orthop Res 20(6):1345-51.

**Sakane M**, Fox RJ, Woo SLY, Livesay GA, Li G, Fu FH (1997) In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. J Orthop Res 15:285-293.

**Schneider U**, Gavenis K (2003) Chondrocytes and collagen gels. Cartilage surgery and future perspectives, ed. Hendrich C, Nöth U, Eulert J, pp. 157-163, Springer Verlag.

**Stäubli HU**, Schatzmann L, Brunner P, Rincon L, Nolte LP (1996) Quadriceps tendon and patellar ligament: cryosectional anatomy and structural properties in young adults. *Knee Surg Sports Traumatol Arthroscopy* 1996:100-110.

**Stecker S**, Parker R (1999) Graft selection in knee cruciate ligament surgery: autograft, allograft, and synthetic. *Operat Tech Orthop* 9:248-255.

**Takeda Y**, Xerogeanes JW, Livesay GA, Fu FH, Woo SLY (1994) Biomechanical function of the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy* 10:140-147.

**Toyoda T**, Matsumoto H, Fujikawa K, Saito S, Inoue K (1998) Tensile load and the metabolism of anterior cruciate ligament cells. *Clin Orthop* 353:247-255.

**Tuan RS**, Boland G, Tuli R (2003) Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5:32-45. Expub 2002 Dec 11. Review.

**Vacanti CA**, Langer R, Schloo B, Vacanti JP (1991) Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo. *J Plastic Recon Surg* 88:753.

**Vacanti JP**, Langer R (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354 (Suppl 1):132-134.

**Van Eijk F**, Saris DB, Riesle J, Willems WJ, Van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJ (2004) Tissue engineering of ligaments: a comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligamen, and skin fibroblasts as cell source. *Tissue Eng* 10(5-6):893-903.

**Viola R**, Sterett W, Newfield D, Steadman J, Torry M (2000) Internal and external tibial rotation strength after anterior cruciate ligament reconstruction using ipsilateral semitendinosus and gracilis tendon autograft. *Am J Sports Med* 28:552-555.

**Wallace M**, Howell S, Hull M (1997) In vivo tensile behaviour of a four-bundle hamstrings graft as a replacement for the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 15:539-545.

**Weiler A**, Scheffler S, Höher J (2002) zum thema: vorderes kreuzband: Transplantatauswahl für den primären Ersatz des vorderen Kreuzbandes. *Orthopäde* 31:731-740.

**Weiss J**, Hoying J, Loui S, Tessen J (2001) Mechanical properties of vascularized collagen gels. 47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Feb 2001, San Francisco, California.

**Woo SLY**, Niyibizi C, Matyas J, Kavalkovich K, Weaver-Green C, Fox RJ (1997a) Medial collateral knee ligament healing: Combined medial collateral and anterior cruciate ligament injuries studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 68:142-148.

**Woo SLY**, Sakane M, Rudy T, Fox R, Fu F (1997b) Comparison of bone-patellar-tendon-bone versus quadruple-hamstrings tendon for anterior cruciate (ACL) reconstruction. *Trans Orthop Res Soc* 43: 99.

**Woo SLY**, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JHC (1999) Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop* 367S:312-323.

**Wredmark T**, Engstrom B (1993) Five-year results of anterior cruciate ligament reconstruction with Stryker Dacron high strength ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1:71-75.

**Yasuda K**, Tsujino J, Ohkoshi Y, Tanabe Y, Kaneda K (1995) Graft site morbidity with autogenous semitendinosus and gracilis tendons. *Am J Sports Med* 23:706-714.

**Young RG**, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthop Res* 16:406-413.

## Danksagung

In erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. C. Hendrich für die Überlassung dieses interessanten Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ulrich Nöth für die engagierte Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Er war immer eine große Hilfe bei der praktischen und theoretischen Umsetzung meiner Arbeit.

Für die Bereitstellung des Kollagengels danke ich der Firma Ars Arthro AG in Esslingen, insbesondere Frau Andrea Heymer für Ihre Unterstützung und Hilfestellung bei der Herstellung der Gelkonstrukte.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Thull am Institut für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg danke ich für die Herstellung und Wartung des Bioreaktor zur zyklischen Dehnung des Kollagenkonstruktes und für die Erstellung des Koreferates.

Ich möchte weiterhin allen Mitarbeitern des Osteologiezentrums und des Labors für klinische Forschung an der Klinik für Orthopädie, König-Ludwig-Haus, insbesondere Herrn PD Dr. N. Schütze, Frau Jutta Schneiderreith und Frau Sabine Balling für die Einführung an den Geräten und in die Techniken sowie für die Hilfestellung bei aufgetretenen Problemen danken. Es machte immer Spaß mit euch zu arbeiten.

Außerdem möchte ich meinen Eltern für die liebevolle, aber auch für die großzügige finanzielle Unterstützung während meines Studiums danken.

Mein Freund Martin Elgert hat mich in dieser Zeit sowohl durch Verständnis, Zuneigung und Hilfestellung bei technischen Problemen sehr unterstützt. Auch ihm möchte ich von ganzem Herzen danken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Kathrin Schupp  
Geburtsdatum: 24.11.1978  
Geburtsort: Würzburg  
Familienstand: ledig  
Eltern und Geschwister:  
Vater: Heinz-Peter Schupp, Studiendirektor  
Mutter: Doris Schupp, geb. Weinmann,  
Volksschullehrerin  
Bruder: Christian Schupp, Informatikkaufmann

## Schulische Ausbildung:

1985 - 1989 Grundschule Sackenbach  
1989 - 1998 Franz-Ludwig-v.-Erthal-Gymnasium Lohr  
Juni 1998 Abschluss mit dem Abitur

## Berufliche Ausbildung:

November 1998 bis Mai 2005 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg  
Mai 2005 Abschluss mit dem Dritten Abschnitt der  
Ärztlichen Prüfung

## Berufliche Weiterbildung:

Ab November 2005 Weiterbildungsstelle für Gynäkologie und  
Geburtshilfe am Krankenhaus Homberg/Efze

Würzburg, den 23. August 2006

Kathrin Schupp