

Aus dem Lehrstuhl für
Tissue Engineering und Regenerative Medizin

der Universität Würzburg

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Charakterisierung von Zellen aus dem vorderen Kreuzband nach Vorderer-
Kreuzband-Ruptur im Hinblick auf das Rupturalter

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eva Katharina Kupczyk

aus Schweinfurt

Würzburg, Juli 2021

Referentin: Prof. Dr. rer. biol hum. Heike Walles

Koreferent: Prof. Dr. med. Rainer H. Meffert

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das vordere Kreuzband	1
1.1.1 Anatomie des vorderen Kreuzbandes	1
1.1.2 Funktion des vorderen Kreuzbandes	2
1.1.3 Die Ruptur Des vorderen Kreuzbandes.....	3
1.1.3.1 Epidemiologie der Ruptur des vorderen Kreuzbandes	3
1.1.3.2 Mechanismen der Ruptur des vorderen Kreuzbandes	3
1.2 Therapieansätze bei Ruptur des vorderen Kreuzbandes.....	4
1.2.1 Stark limitierte Selbstheilungstendenz des vorderen Kreuzbandes	5
1.2.1.1 Regeneration von Sehnen und Bändern	5
1.2.1.2 Limitationen der direkten Heilung des vorderen Kreuzbandes	6
1.2.2 Aktuelle operative Möglichkeiten nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes	7
1.2.2.1 Die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels klassischer Ersatzplastik	7
1.2.2.2 Neuere rekonstruktive Verfahren	8
1.2.3 Der Faktor Zeit bei Therapie einer Ruptur des vorderen Kreuzbandes	9
1.3 Mesenchymale Stammzellen.....	10
1.3.1 Regeneratives Potential Mesenchymaler Stammzellen	11
1.3.2 Humane Mesenchymale Stammzellen im vorderen Kreuzband.....	12
1.4 Therapeutische Anwendung adulter Stammzellen nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes	12
1.4.1 Anwendung in Tierstudien.....	13
1.4.2 Klinische Anwendung.....	14
1.5 Ziel der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Ethikvotum	17
2.2 Material	17
2.2.1 Biologisches Material.....	17
2.2.1.1 Zellkultur	17
2.2.1.2 Bandkonstrukte.....	19

2.2.2 Lösungen und Chemikalien	19
2.2.2.1 Allgemeine Lösungen und Chemikalien	19
2.2.2.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur	23
2.2.2.3 Lösungen und Chemikalien für Histologie und Immunhistochemie	25
2.2.3 Antikörper	26
2.2.4 Enzyme.....	28
2.2.5 Kits	29
2.2.6 Labor- und Verbrauchsmaterialien	29
2.2.7 Geräte, Ausrüstung und Software	31
2.3 Methoden	34
2.3.1 Steriler Arbeitsplatz	34
2.3.2 Zellkulturmethoden	35
2.3.2.1 Isolation und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus vorderen Kreuzbändern.....	36
2.3.2.2 Zählung und Vitalitätsbestimmung	38
2.3.2.3 Passagieren von Zellen.....	40
2.3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
2.3.3 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen	44
2.3.4 Wachstumspotential und Zellviabilität.....	47
2.3.4.1 Wachstumskurve in 24well-Platte	48
2.3.4.2 MTT Zellviabilitätstest.....	50
2.3.5 Durchflusszytometrie.....	51
2.3.6 Herstellung und Kultivierung von Bandkonstrukten.....	52
2.3.6.1 Gewinnung von Kollagenfasern aus Rattenschwänzen	52
2.3.6.2 Herstellung von Kollagengel aus Rattenschwanzfasern	54
2.3.6.3 Herstellung von Bandkonstrukten aus Kollagenfäden	55
2.3.6.4 Besiedelung und Kultivierung der Bandkonstrukte mit Kollagengel mit und ohne Zellen ...	57
2.3.7 Histologie	59
2.2.7.1 Vorbereitende Maßnahmen	59
2.2.7.2 H.E.-Färbung	61
2.3.7.3 Alcianblaufärbung.....	63
2.3.7.4 Ölrotfärbung	65
2.3.7.5 Alizarinrot-S-Färbung.....	66
2.3.7.6 Masson-Goldner-Trichromfärbung.....	67
2.3.8 Immunhistochemische Färbung	68

2.3.9 Biomechanische Messung	72
2.3.10 Statistische Auswertung	73
3 ERGEBNISSE	75
3.1 Einteilung der Biopsien sowie Analyse der Patientendaten.....	75
3.2 Quantitative Charakterisierung der isolierten Zellen.....	78
3.2.1 Zellzahl	78
3.2.2 Zellwachstum.....	79
3.2.3 Zellviabilität	84
3.3 Nachweis von Mesenchymalen Stammzellen in den Biopsien aus Vorderen Kreuzbändern.....	85
3.3.1 Differenzierungspotential.....	86
3.3.2 Oberflächenantigene	90
3.4 Ergebnisse der Kultivierung der Bandkonstrukte	94
3.4.1 Makroskopische Beurteilung	94
3.4.2 Biomechanik	96
3.4.3 Histologische Beurteilung	98
4 DISKUSSION.....	101
4.1 Methodische Überlegungen	101
4.2 Einfluss der Latenz zwischen Ruptur und Biopsieentnahme auf die isolierten Zellen	104
4.3 Beurteilung der kultivierten Bandkonstrukte	107
4.4 Limitationen.....	110
4.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse	112
4.6 Ausblick	114
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	116
6 LITERATURVERZEICHNIS	117

APPENDIX.....	1
I Abkürzungsverzeichnis.....	1
II Abbildungsverzeichnis	4
III Tabellenverzeichnis	6
IV Danksagung	7
V Lebenslauf	9
VI Publikationen und Kongressteilnahmen	10

1 EINLEITUNG

1.1 DAS VORDERE KREUZBAND

Das vordere Kreuzband (VKB) bildet gemeinsam mit dem hinteren Kreuzband sowie den beiden Seitenbändern den Bandapparat des Kniegelenks. Es übernimmt in diesem aus Articulatio (Art.) femorotibialis und Art. femoropatellaris bestehenden Gelenk verschiedene wichtige stabilisierende sowie propriozeptive Aufgaben [1]. Diese werden im folgenden Kapitel ebenso wie die Anatomie des VKBs genauer betrachtet. Außerdem werden die Epidemiologie der Kreuzbandverletzung sowie die bei Ruptur zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten erläutert.

1.1.1 ANATOMIE DES VORDEREN KREUZBANDES

Die beiden Kreuzbänder, Ligamenta (Ligg.) cruciata genus, sind Teil des Kniegelenks, Art. genus, und liegen intrakapsulär, jedoch extrasynovial. Sie wandern im Laufe der Entwicklung von dorsal in die Fossa intercondylaris ein. Das Ligamentum (Lig.) cruciatum anterior (LCA), auch als Vorderes Kreuzband (VKB) oder Anterior cruciate ligament (ACL) bezeichnet, entspringt medialseitig an der lateralen Femurkondyle und verläuft nach ventral, distal bis zur Area intercondylaris anterior der Tibia. Das Lig. cruciatum posterior kreuzt das LCA innerhalb des Gelenks und verläuft von der lateralseitigen medialen Femurkondyle nach dorsal an die Area intercondylaris posterior der Tibia [1].

Das LCA besteht aus mehreren Faserbündeln. Einige Autoren beschreiben eine Teilung in ein anteriomediales Bündel (AM) und ein posterolaterales Bündel (PL), welche histologisch jedoch nicht klar voneinander getrennt sind [2-5]. In anderen Kadaverstudien wird zusätzlich ein drittes Faserbündel, das intermediäre Bündel (IM), mit anders gerichtetem Faserverlauf beschrieben [6, 7]. Die Insertionszonen des LCA femoral und tibial sind jeweils oval [3, 4, 7], femoral nimmt diese eine Fläche von ca. 124,6 mm² und tibial von ca. 119,1 mm² ein [7]. Der mittlere Teil des Bandes hingegen ist nicht oval, sondern flach mit ungefähr 15 mm Länge und 5 mm Breite [3]. Die durchschnittliche Querschnittsfläche beträgt 42,50 mm² (Männer 48,9 mm², Frauen

36,1 mm²) [8]. Durch die unterschiedliche Ausrichtung der femoralen und tibialen Insertionsfläche wirkt es so, als ob sich die Faserbündel insbesondere bei Flexion des Knies umeinanderwinden. Bei Knieextension verlaufen die Fasern jedoch nahezu parallel [3, 5, 7, 9].

Die Extrazellulärmatrix (EZM) des LCA besteht aus gebündelten, straffen Kollagenfibrillen [5, 10]. Diese bestehen vorwiegend aus Kollagen I und werden durch retikuläre Fasern voneinander getrennt. Im lockeren Bindegewebe zwischen den einzelnen Kollagenfaserbündeln befinden sich Kollagen III, Fibrozyten sowie einige Chondrozyten. Zusätzlich kann Kollagen II im Bereich der Insertionszonen des LCA nachgewiesen werden [10]. Das straffe Bindegewebe inseriert hier übergehend in Faserknorpel in den Knochen, ähnlich einem chondral-apophysären Bandansatz [2, 5].

Die Blutversorgung des LCA erfolgt über die das LCP versorgenden Äste der Arteria (A.) genus media sowie distal zudem aus Ästen der A. inferior medialis genus sowie der A. inferior lateralis genus [2, 10].

1.1.2 FUNKTION DES VORDEREN KREUZBANDES

Die Hauptfunktion des VKBs ist die Verhinderung der Translation der Tibia gegen das Femur nach ventral sowie nach medial. Nach VKB-Ruptur ist die anterior-tibiale Verschiebung bei 35° Flexion im Kniegelenk am größten [11, 12]. Außerdem begrenzen vorderes und hinteres Kreuzband gemeinsam die Innenrotation im Kniegelenk, da sie sich bei dieser Bewegung umeinanderwickeln. So stabilisieren sie das Gelenk zusätzlich. Ferner üben die Kreuzbänder bei Varus- sowie Valgusstress eine stabilisierende Funktion aus [12-14]. Zusätzlich befinden sich besonders an den Insertionszonen des VKB Mechanorezeptoren, darunter Vater-Paccini-Körperchen, Ruffini-Körperchen sowie freie Nervenendigungen, welche von großer Bedeutung für die Kinematik im Kniegelenk sind. Auch deshalb kommt es bei Ruptur des VKBs zu einem erheblichen Defizit in der Gelenkstabilisierung neben dem Verlust der mechanischen Begrenzungsstruktur [15-18].

1.1.3 DIE RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

1.1.3.1 EPIDEMIOLOGIE DER RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

Eine Knieverletzung ist eine häufige Gelenkverletzung und unter Sportlern besonders gefürchtet, da konsekutiv meist eine lange Sportkarenz erforderlich ist. In ca. 40% der Fälle liegt eine ligamentäre Beteiligung vor, bei über 50% ist hier das VKB (mit)betroffen [19]. Untersuchungen zufolge erleiden ca. 100.000 Menschen jährlich in den USA eine VKB-Ruptur, die Tendenz ist eher steigend [20-22]. Bei über 50% wird eine Bandrekonstruktion durchgeführt [20, 21]. Dies kostet ca. 1 Milliarde US-Dollar pro Jahr. Hinzu kommen die Kosten für Rehabilitationsmaßnahmen, Langzeitschäden und Ausfall der Erwerbstätigkeit oder ein konservatives Therapieregime. Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes stellt also einen sozioökonomisch relevanten Kostenpunkt im Gesundheitssystem dar [20]. Peat et al. konnten in einer über neun Jahre angelegten Studie für die Diagnose S83.5 {Verstauchung und Zerrung des Kniegelenkes mit Beteiligung des (vorderen) (hinteren) Kreuzbandes} in Skandinavien eine Inzidenz von 71 pro 100.000 feststellen. Außerdem konnte evaluiert werden, dass Weichteilschäden am Knie insbesondere Heranwachsende und junge Erwachsene betreffen. Sie treten vor allem im Frühjahr und Herbst auf [23]. In den letzten Jahren sind immer mehr Menschen sportlich aktiv. Mit dieser Entwicklung steigt auch die Anzahl der Sportverletzungen [19, 24]. Eine von Mall et al. 2014 veröffentlichte Studie zeigte einen Anstieg der VKB-Rupturen in den Vereinigten Staaten von 1994 32,9 Rupturen pro 100.000 Einwohner auf 2006 43,5 Rupturen pro 100.000 Einwohner [25]. Dieser Trend vollzieht sich in den letzten Jahren insbesondere in der weiblichen Bevölkerung, welche insgesamt ein höheres Risiko für Verletzungen bei gleicher sportlicher Aktivität hat. So sind Frauen etwa 2,4 bis 4,1 Mal oder sogar 8 Mal mehr für eine VKB-Ruptur gefährdet als Männer [8, 25-27].

1.1.3.2 MECHANISMEN DER RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

Eine VKB-Ruptur wird nicht durch einen einzigen Mechanismus verursacht, weshalb der exakte Bewegungsablauf schwer zu beschreiben ist. Es handelt sich um eine

komplexe multi-planare Kniebewegung, welche letztlich zum Versagen des Bandes führt. Eine wichtige Unterscheidung ist jedoch, ob es mit (ca. 25%) oder ohne Gegnerkontakt (ca. 75%) zur Kreuzbandruptur kommt [24, 28].

Die VKB-Ruptur ohne Gegnerkontakt wird insbesondere beim Tempowechsel beobachtet oder in anderen Situationen, in denen Kräfte multidirektional auf das Gelenk wirken. Beispiele hierfür sind eine Landung nach einem Sprung oder eine Verdrehung im Kniegelenk bei festgestelltem Fuß, wie sie beim Skifahren auftreten kann. Häufig ist eine Kombination aus Valgusstress und Rotationsmoment ursächlich für die Ruptur [24, 29, 30]. Außerdem vergrößern sich die auf das VKB wirkenden Kräfte bei leichter Flexion bis Hyperextension durch eine Dysbalance zwischen den auf das Kniegelenk wirkenden Muskelgruppen. Eine verstärkte Anspannung des M. quadriceps in Kombination mit einer abgeschwächten Hamstring-Kontraktion, vor allem bei gleichzeitiger Flexion im Hüftgelenk, führt zu einer höheren Spannung auf das VKB und somit zu einem höheren Rupturrisiko [28, 31, 32]. In einer Videoanalyse konnten Boden et al. folgende Kombination der Gelenkstellung als mögliche Risikofaktoren für eine VKB-Ruptur nach Sprung identifizieren: plattfüßige Landung oder initiales Aufkommen mit dem Hinterfuß bei Flexion im Hüftgelenk und Knieabduktion [33].

Bei einer VKB-Ruptur, welche mit Gegnerkontakt oder als Folge eines Hochrasanztraumas zustande kommt, sind meist ähnlich gerichtete multidirektional wirkende Kräfte ursächlich. Ein abruptes Abbremsen oder ein plötzlicher Richtungswechsel können der Verletzung zugrunde liegen. Häufig kommt es durch die höhere Energie der wirkenden Kräfte zusätzlich zu Begleitverletzungen wie Innenbandruptur, Meniskusschaden oder Frakturen [24, 28, 30].

1.2 THERAPIEANSÄTZE BEI RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

Im Falle einer VKB-Ruptur gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten, die VKB-Rekonstruktion und die konservative Therapie. Durch konservative Therapiemaßnahmen, wie beispielsweise intensive Physiotherapie, kann keine Bandregeneration erzielt werden. Studien zeigen, dass nach fünf Jahren kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser beiden Therapieoptionen

besteht, vorausgesetzt es wird eine suffiziente Rehabilitation durchgeführt und gegebenenfalls im Verlauf bei höhergradiger Instabilität vom konservativen auf das operative Therapieregime gewechselt. Eine Konversion des Therapieregimes von konservativ zu operativ ist bei ca. einem Drittel der Patienten aufgrund einer zu hohen Instabilität nötig. Inwieweit sich die langfristige Entwicklung im Hinblick auf Begleit- und Folgeverletzungen, Verschleiß sowie sportlicher Aktivität unterscheidet, ist noch nicht ausreichend untersucht [34-39].

1.2.1 STARK LIMITIERTE SELBSTHEILUNGSTENDENZ DES VORDEREN KREUZBANDES

1.2.1.1 REGENERATION VON SEHNEN UND BÄNDERN

Die Regeneration von Sehnen und Bändern wird klassischerweise in drei Phasen eingeteilt – (1) Inflammationsphase, (2) Proliferations- oder Reparationsphase und (3) Remodelling [40-43]. Durch eine Verletzung kommt es in der Inflammationsphase zu Einblutung und Bildung eines Blutgerinnsels sowie zur Einwanderung von Entzündungszellen wie Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Zudem werden verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt [42-44]. Ein entscheidender Faktor für die suffiziente Regeneration des Bandes ist die Restrukturierung der Blutversorgung, da die Kollagensynthese ein stark sauerstoffabhängiger Mechanismus ist [43]. Die Rekrutierung von Tenozyten beginnt kurz vor Übertritt in die zweite Phase [40, 45].

Die Proliferationsphase beginnt ungefähr zwei Tage nach Verletzung. Nun folgt zusätzlich die Aktivierung von Fibroblasten aus Paratenon und Synovialmembran. Makrophagen schütten Wachstumsfaktoren aus, welche Zellproliferation und Bildung von EZM und Kollagen induzieren. Zuerst überwiegt die Bildung von Kollagen III, später werden auch vermehrt Kollagen I und Glykosaminoglykane produziert [40, 42, 44, 46]. Hierbei dient das zu Beginn gebildete Fibringerinnsel als stabilisierende Leitstruktur [41, 42].

Nach ca. ein bis zwei Monaten beginnt die letzte Regenerationsphase, das Remodelling. In dieser Phase richten sich Tenozyten und Kollagenfasern in Richtung

der Belastung aus [40, 42]. Es wird immer mehr Kollagen I produziert, dementsprechend sinkt der Anteil an Zellen, Kollagen III sowie Glykosaminoglykanen. Es entsteht narbiges Bandgewebe [40, 44]. Das reparierte Gewebe erreicht allerdings auch zwölf Monaten nach Verletzung nicht wieder die gleichen biomechanischen oder ultrastrukturellen Eigenschaften wie ein natives Band [42, 47].

1.2.1.2 LIMITATIONEN DER DIREKTEN HEILUNG DES VORDEREN KREUZBANDES

Es stellt sich nun die Frage, weshalb das VKB im Gegensatz zu anderen Ligamenten wie beispielsweise dem medialen Kollateralband (MCL) nicht spontan ohne chirurgische Intervention heilt, obwohl Bänder grundsätzlich regenerationsfähig sind [41, 48, 49].

Es werden verschiedene Faktoren diskutiert, um diese Unterschiede zu erklären. Ein Schlüsselmechanismus für das Versagen der VKB-Regeneration ist die fehlende Formierung eines Blutgerinnsels, wodurch die Anzahl der verschiedenen Entzündungszellen sowie die Konzentrationen von EZM-Proteinen und Zytokinen am Ort der Verletzung geringer sind [41, 50]. Außerdem fehlt so die entscheidende Leitstruktur für die Heilung des Bandes. Ursächlich für die fehlende Formation eines Gerinnsels ist unter anderem die intraartikuläre Lage des VKBs. Die ständige Umspülung des Bandes mit Synovialflüssigkeit verhindert die Formation eines stabilen Fibringerüsts [41, 48]. Hierdurch ist auch die geringere Konzentration an Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu erklären [41, 48, 51, 52]. Dahingegen konnte nachgewiesen werden, dass sich Proliferationspotential sowie Kollagenproduktion zwischen VKB-Fibroblasten und MCL-Fibroblasten nicht unterscheidet und auch die Blutzufuhr zum Kreuzband suffizient ist [41, 48, 53].

Ebenso führte auch der Versuch der direkten Kreuzbandnaht zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, in über 90% war diese nicht erfolgreich und das Kniegelenk instabil. Deshalb ist die VKB-Ersatzplastik bis heute die operative Therapie der Wahl [41, 54, 55], wenn auch immer noch das Ziel verfolgt wird, ein alternatives Verfahren zu entwickeln.

1.2.2 AKTUELLE OPERATIVE MÖGLICHKEITEN NACH RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

1.2.2.1 DIE REKONSTRUKTION DES VORDEREN KREUZBANDES MITTELS KLASSISCHER ERSATZPLASTIK

Zur VKB-Rekonstruktion können verschiedene Techniken angewendet werden. Etabliert sind der Ersatz mittels autologer Patellasehne an Knochenblöcken aus Tuberositas tibiae und Patellaspitze oder mittels autologer Hamstring-Sehne (Semitendinosus- mit oder ohne Gracilissehne). Diese beiden Verfahren unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich der Langzeitergebnisse, wenn auch die Entnahmemorbidität bei der Patellasehnen-Plastik insbesondere bei kniender Tätigkeit etwas höher ist und auch die Inzidenz von Osteoarthrose nach fünf Jahren höher ausfällt [56-58]. Auch möglich ist der Ersatz mittels autologer Quadrizepssehne. Obwohl vielversprechende Studienergebnisse für diese Technik vorliegen, wird sie verhältnismäßig selten durchgeführt [59-62]. Insbesondere im Falle einer Reruptur kann zur Rekonstruktion zusätzlich die Verwendung eines Allografts in Betracht gezogen werden. Das Outcome ist hier jedoch schlechter, es kommt dreimal häufiger zum Transplantatversagen [63].

In den letzten Jahren wurde zudem diskutiert, ob mit der Doppel-Bündel-Technik, die sich enger an der ursprünglichen Anatomie des VKBs orientiert, bessere Ergebnisse als mit der Einzel-Bündel-Technik erzielt werden können. Mehrere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die Doppel-Bündel-Technik der Einzel-Bündel-Technik hinsichtlich Rotationsstabilität und anterior-posteriorer Translation statistisch signifikant überlegen ist. Ob diese Ergebnisse jedoch auch klinisch relevant sind, ist nicht geklärt. Ebenso müssen die höheren Kosten, die kompliziertere Operationsmethode sowie die längere Operationsdauer hierzu in Relation gesetzt werden. Demnach kann noch nicht abschließend beurteilt werden, ob eine der beiden Techniken im Langzeitverlauf signifikant bessere klinische Ergebnisse liefert [64-69].

1.2.2.2 NEUERE REKONSTRUKTIVE VERFAHREN

Ziel einer Operation nach VKB-Ruptur ist es, die funktionelle Anatomie im Kniegelenk wiederherzustellen [70]. Auch wenn frühere Versuche, eine direkte Heilung des rupturierten Kreuzbandes zu erzielen, ohne durchschlagenden Erfolg blieben, werden in den letzten Jahren neue Ansätze entwickelt, in der operativen Therapie ohne VKB-Ersatzplastik auszukommen. Neben der Annahme, dass so die anatomischen Verhältnisse und propriozeptiven Eigenschaften besser wiederhergestellt werden können, ist auch die Vermeidung einer Entnahmemorbidität Motivation für die Entwicklung einer solchen Technik. Ein vielversprechender Ansatz ist das sogenannte Ligament bracing. Durch die „Schienung“ des rupturierten Kreuzbandes soll dieses augmentiert sowie eine Leitstruktur geschaffen werden, an welcher sich das Band regenerieren kann [71]. Eine Schwierigkeit ist hierbei, die Balance zwischen Flexibilität und Steifigkeit zu finden. So weiß man, dass sich das Band je nach gewählter Operationstechnik zwischen 90° Flexion und 0° Extension zwischen 4,5 mm und 6,7 mm dehnen muss [72]. Die Versorgung der VKB-Ruptur mittels intraligamentärer dynamischer Stabilisierung (DIS), welche eine Heilung des rupturierten VKBs ohne Ersatzplastik ermöglichen soll, ist eines dieser neueren Verfahren. Aktuell wird diese Technik im Rahmen von Studien erprobt, welche jedoch bereits im klinischen Einsatz vielversprechende Ergebnisse liefern [70, 73, 74]. Beispielsweise konnten Ateschrang et al. in einer klinischen Studie, in der insgesamt 47 Patientinnen innerhalb der ersten 21 Tage nach VKB-Ruptur mittels DIS (Ligamys™) therapiert wurden, bei 44 Patienten eine suffiziente Vorspannung des VKBs sechs Monate postoperativ nachweisen. Ebenso war die subjektive Zufriedenheit der Patienten gut [70]. Auch andere Autoren konnten nachweisen, dass mit der DIS mit Ligamys™ sowohl in experimentellen als auch klinischen Untersuchungen gute Ergebnisse erzielt werden konnten [75, 76].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist, das intraartikuläre Milieu durch minimalinvasive operative Maßnahmen zu verbessern. Hierzu werden Mikrofrakturierungen in das Femur im Bereich der Insertionszone des VKBs gesetzt sowie der tibiale Kreuzbandstumpf mehrfach perforiert [77, 78]. Durch diese Technik der Mikrofrakturierung soll das Heilungspotential durch ein progeneratives Milieu

mit Hämatom und Induktion der Zellmigration geschaffen werden [78]. Steadman et al. konnten insbesondere bei heranwachsenden Patienten mit dieser Technik gute Erfolge ohne weitere operative Maßnahme erreichen [77].

Als besonders erfolgsversprechend wird ein ligamenterhaltendes Verfahren ohne allogene Bandplastik bei Rupturen im proximalen Drittel des VKBs angesehen, da hier ein auf histologischer Ebene ähnliches Heilungspotential wie das des Innenbandes nachgewiesen werden konnte [79]. Dieses wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass in diesem Bereich die Vaskularisierung am stärksten ausgeprägt ist [2].

1.2.3 DER FAKTOR ZEIT BEI THERAPIE EINER RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

Nach der Entscheidung für eine operative Therapie der VKB-Ruptur stellt sich die Frage, wann genau ein geeigneter Zeitpunkt für die Rekonstruktion ist. Allerdings existiert keine einheitliche Einteilung, welche Latenzzeit zwischen Ruptur und Rekonstruktion als „(sub)akut“ bzw. „verspätet“ bezeichnet wird. In der Literatur wird von einer „(sub)akuten“ Versorgung gesprochen, wenn diese 2 Tage oder aber 7 Monate nach Ruptur durchgeführt wurde. Einige Autoren bezeichnen dagegen bereits eine Versorgung drei Wochen nach Trauma als „verspätet“, andere eine Operation nach 24 Jahren [80-82]. So ist es allein aufgrund der unterschiedlichen Nomenklatur schwierig, eine verlässliche Aussage bezüglich eines optimalen Therapiezeitpunkts zu treffen.

Gonarthrose ist ein Problem, das potenziell mit einer verspäteten VKB-Rekonstruktion vergesellschaftet ist. Einige Studien konnten hierfür Hinweise sammeln, andere verneinen einen Zusammenhang [37, 38, 80, 83, 84]. Jedoch ist die Gonarthrose eng mit einer im Rahmen der Arthroskopie durchgeführten Meniskus(teil)resektion vergesellschaftet, welche als Ursache für die Spätfolgen nicht klar abgegrenzt werden kann. Diese beeinflusst auch das Outcome hinsichtlich Stabilität, Beweglichkeit und subjektivem Empfinden [38, 85, 86]. Ob hinsichtlich dieser Kriterien ein Unterschied zwischen früher und später Rekonstruktion besteht, ist ebenfalls nicht abschließend geklärt [37, 38, 80, 83, 87].

Eine gefürchtete Komplikation bei zu früher VKB-Rekonstruktion ist die postoperative Steifigkeit im Kniegelenk sowie die Entwicklung einer Arthrofibrose. Auch bezüglich dieser Fragestellung ist die Studienlage nicht eindeutig [82, 87-89].

Neben der Betrachtung der postoperativen Klinik kann potenziell auch durch die Analyse der präoperativen Situation im Kniegelenk eine Aussage dazu getroffen werden, ob es einen hinsichtlich des Regenerationspotentials besonders vielversprechenden Zeitpunkt für die Versorgung gibt. Die Analyse der Konzentration sowie der Eigenschaften von bestimmten Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren oder auch Zellen im VKB bzw. dem Kniegelenk sind hierbei potenzielle Orientierungspunkte [81, 90, 91]. Die aktuelle Studienlage ist jedoch noch sehr dünn, weshalb keine eindeutige Empfehlung ausgesprochen werden sollte.

1.3 MESENCHYMALE STAMMZELLEN

Mesenchymale Stammzellen (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) sind in den letzten Jahrzehnten immer stärker in den Mittelpunkt der Forschung gerückt [92-94]. Lange Zeit gab es jedoch keinen klaren Konsens, welchen Kriterien eine Zelle genau entsprechen muss, um als MSC definiert zu werden [92, 93]. Ebenso wird das Akronym MSCs nicht einheitlich verwendet. Gängig sind die Bezeichnungen „Mesenchymale Stammzellen“ und „Mesenchymale Stromazellen“, 2017 brachte Caplan die Bezeichnung „Medicinal Signaling Cells“ ins Gespräch [92, 95]. MSCs können aus dem Knochenmark von Menschen und Säugetieren isoliert werden und werden dann als Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) bezeichnet. Aber auch aus anderen Gewebetypen wie Fettgewebe, Synovialmembran, Skelettmuskulatur, Nabelschnurblut oder Sehnen und Bändern ist eine Isolation ähnlich gearteter Zellen möglich. Ob die Eigenschaften dieser Zellen mit denen von BMSCs vergleichbar sind, war lange unklar [92, 93, 96-99].

Deshalb legte die Society for Stem Cell Therapy 2006 folgende drei minimal zu erfüllende Kriterien für MSCs fest:

1. Plastikadhärenz in Standardkultur
2. Spezifisches Oberflächenantigenmuster
≥ 95% positiv für: CD105, CD73 und CD90

≥ 98% negativ für CD45, CD34 und CD14 oder CD11b und CD79α oder CD19 und HLA Klasse II

3. Multipotentes Differenzierungspotential in osteogene, adipogene und chondrogene Zellreihen

Nur bei Erfüllung dieser Kriterien kann eine Zellkultur als MSC-Kultur bezeichnet werden. Auch wenn es sich hierbei um die minimal zu erfüllenden Kriterien handelt, fordern Dominici et al. Wissenschaftler dazu auf, eine für die jeweilige Fragestellung sinnvolle Auswahl insbesondere an Oberflächenantigenen zu treffen [92].

1.3.1 REGENERATIVES POTENTIAL MESENCHYMALER STAMMZELLEN

MSCs haben ein großes regeneratives Potential. Zum einen differenzieren sie in entsprechendem Milieu in verschiedene Zellarten vom Bindegewebstyp [92, 100]. So unterstützen MSCs die Regeneration von Knochen, Muskulatur, Knorpel, Sehnen und Bändern sowie weiteren Gewebstypen [100-103]. Des Weiteren sekretieren MSCs verschiedene bioaktive Substanzen wie Zytokine und Wachstumsfaktoren. Es kommt hierdurch zu niedrigeren Konzentrationen von TNF-α und INFγ sowie einer erhöhten IL-10 Konzentration, wodurch wiederum die T-Zell-Antwort sowie deren Expansion gehemmt wird. Diese immunsuppressiven und trophischen Effekte limitieren die Zerstörung von Gewebe und schaffen gleichzeitig ein pro-regeneratives Mikromilieu [104-106]. Dies begrenzt Apoptose und Vernarbung und ermöglicht gleichzeitig die Mitose gewebstypischer Progenitorzellen sowie die Initialisierung der Angiogenese [100].

Diese Eigenschaften bilden die Grundlage der Entwicklung MSC-gestützter Therapien. Im Tissue Engineering existieren bereits zahlreiche Modelle MSC-gestützter Scaffolds, beispielsweise im Bereich von Meniskus- oder Knorpelersatz [107-109]. Ebenso gibt es im Bereich der Regenerativen Medizin verschiedene Ansätze, bspw. nach Myokardinfarkt und bei Meniskus- oder VKB-Regeneration, bei denen MSCs die Selbstheilungstendenz des Gewebes unterstützen und den Schaden begrenzen sollen [110-112]. Darüber hinaus konnten MSCs bei steroidrefraktärer akuter Graft versus

Host Disease (GvHD) erfolgreich als Immunmodulatoren zur Anwendung gebracht werden [113-115].

1.3.2 HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN IM VORDEREN KREUZBAND

Verschiedene Forschungsgruppen konnten bereits präsentieren, dass die Isolation von MSCs aus dem intakten und aus dem rupturierten vorderen Kreuzband (im Folgenden VKB-MSCs) möglich ist [97, 98, 116, 117]. Sie sind vorwiegend entlang der Kollagenfasern und der Blutgefäße zu finden. Zusätzlich konnten unabhängige MSC-Kolonien im VKB nachgewiesen werden, welche ein besonders hohes Potential für regenerative Aktivität bieten [98]. Verglichen mit aus dem Knochenmark gewonnenen BMSCs haben die VKB-MSCs sehr ähnliche, wenn auch nicht identische Eigenschaften sowie Oberflächenantigene. Ob Proliferations-, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential kleiner oder größer sind, wird kontrovers diskutiert. Das adipogene Differenzierungspotential der VKB-MSCs scheint etwas geringer ausgeprägt zu sein, dahingegen ist das Potential zur Ligamentogenese größer [98, 117, 118]. Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen dem regenerativen Potential von VKB-MSCs junger und alter Patienten [119].

1.4 THERAPEUTISCHE ANWENDUNG ADULTER STAMMZELLEN NACH RUPTUR DES VORDEREN KREUZBANDES

Adulte Stammzellen sind entweder multipotent, wie beispielsweise hämatopoetische Stammzellen oder MSCs, oder unipotent, wie beispielsweise epidermale Stammzellen [120]. Zusätzlich verbessern sie durch Ihre trophischen und immunmodulatorischen Effekte das Mikromilieu am Ort einer Verletzung [104-106]. Diese Eigenschaften versprechen positive Effekte auf die Regeneration von Gewebe, weshalb sie in Tissue Engineering und Regenerativer Medizin in vielfältiger Art und Weise zur Anwendung gebracht werden [109, 111, 112, 115, 120, 121]. Verschiedene Forschungsgruppen arbeiten an Anwendungsmöglichkeiten, um dieses Potential auch im Bereich der VKB-Therapie nutzen zu können [122-134].

1.4.1 ANWENDUNG IN TIERSTUDIEN

Eine mögliche Anwendung ist die intraartikuläre Injektion von BMSCs. Kanaya et al. konnten eine akzelerierte VKB-Regeneration in Ratten nach Injektion von $1 \cdot 10^6$ BMSCs in PBS⁻ nachweisen [126]. Ähnliche Ergebnisse konnten Oe et al. mit frischen Knochenmarkszellen bzw. kultivierten MSCs in gleicher Konzentration erzielen [124]. Beide Autoren sehen in dieser Methode ein hohes Potential für die Anwendung insbesondere bei Teilrupturen des vorderen Kreuzbandes [124, 126]. Auch die Applikation von BMSCs im Bereich der Bohrkanäle bei Rekonstruktion scheint positive Effekte zu haben. Lim et al. konnten eine verbesserte Einheilung des Transplantats in Kaninchen nachweisen [128]. Dieses Ergebnis wurde im Verlauf bestätigt [134].

Mifune et al. haben nachgewiesen, dass CD34⁺ vaskuläre Stammzellen aus VKB-Gewebe eine Rolle bei der Gefäßneubildung nach VKB-Ruptur spielen [122]. Darauf aufbauend untersuchten verschiedene Forschungsgruppen den Effekt dieser Zellen auf die Regeneration nach VKB-Rekonstruktion. Es konnte eine akzelerierte osteochondrale Einheilung nachgewiesen werden [129, 135]. Darüber hinaus kam es aber auch zu einer unproportional hohen Kollagen III-Bildung im Vergleich zu nativem VKB-Gewebe [129]. Dies führen die Autoren auf die Akzeleration zu Beginn der Regeneration zurück, da hier besonders viel Kollagen III gebildet wird, und auf eine Angleichung der Heilungsgeschwindigkeit im Verlauf [40, 42, 44, 46, 129].

Neben der Anwendung von Stammzellen allein durch intraartikuläre Injektion in einer Trägersubstanz können diese auch gekoppelt an ein Scaffold eingesetzt werden. Figueroa et al. untersuchten das Outcome einer VKB-Naht (1) ohne weitere Intervention, (2) mit Kollagen I-Scaffold sowie (3) mit Kollagen I-Scaffold in Kombination mit BMSCs im Kaninchen. Durch den Zusatz von BMSCs konnte eine verbesserte Regeneration des Bandes erzielt werden [130]. Auch Kouroupis et al. konnten die positiven Effekte eines stammzellbasierten bioartifiziellen VKB im Vergleich zur Anwendung des gleichen Materials ohne Stammzellen nachweisen [127]. Dahingegen gelang der Nachweis eines zusätzlichen positiven Effekts von MSCs im Vergleich zu einem vollblutbasierten Scaffold bei Proffen et al. nicht [131].

Bei all diesen Untersuchungen handelt es sich jedoch um schwer miteinander zu vergleichende Versuchsansätze mit unterschiedlichen Scaffolds und Zelltypen. Auch wenn die Ergebnisse zum Teil vielversprechend sind, ist ihre Relevanz für die Klinik noch nicht zuverlässig beurteilbar.

1.4.2 KLINISCHE ANWENDUNG

Um die Übertragbarkeit der aus Tierstudien gewonnenen Erkenntnisse auf die klinische Anwendung besser abschätzen zu können, führten wenige Forschungsgruppen Untersuchungen durch, in welchen adulte Stammzellen in der Therapie einer humanen VKB-Ruptur zum Einsatz kamen. Insbesondere bei VKB-Teilrupturen konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden [132, 133]. Darüber hinaus konnten Wang et al. 2017 in einer kontrollierten doppel-blinden randomisierten Studie nachweisen, dass die intraartikuläre Injektion allogener mesenchymaler Progenitorzellen sicher ist und auch gut toleriert wird. Zusätzlich vermuten die Autoren einen positiven Einfluss auf Outcome und Symptome [123]. Eine bessere Einheilung eines VKB-Transplantats in den Knochen bei Installation nicht kultivierter adulter BMSCs in den femoralen Bohrkanal konnte beim Menschen bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden [125].

Wie von Hunt 2018 treffend beschrieben gibt es trotz diverser vielversprechender Tiermodelle jedoch noch viel zu wenige klinische Studien, in denen adulte Stammzellen in der VKB-Therapie zum Einsatz kommen, um eine belastbare Aussage über deren Nutzen treffen zu können [136].

1.5 ZIEL DER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob auf zellulärer Ebene ein Zusammenhang zwischen der Latenz zwischen Operation (Probeentnahme) und Rupturzeitpunkt und der Regenerationsfähigkeit des Gewebes besteht. Viele der Arbeiten, welche sich mit den Unterschieden zwischen einer akuten, subakuten oder verzögerten VKB-Rekonstruktion befassten, legten ihr Augenmerk auf die klinische Situation im Verlauf der Rehabilitation [37, 38, 80, 82, 83]. In dieser Arbeit soll hingegen durch die

Aufarbeitung von intraoperativ bei Rekonstruktion gewonnenen VKB-Biopsien untersucht werden, ob sich der Anteil der enthaltenen, potenziell regenerationsfördernden mesenchymalen Stammzellen intraligamentär im Zeitverlauf verändert. Ebenso soll erforscht werden, ob sich die isolierten Zellen hinsichtlich ihres Proliferations- sowie Differenzierungspotentials unterscheiden. Ähnliche Untersuchungen wurden bisher nur sehr spärlich durchgeführt [81, 90, 91]. Nohmi et al. 2012 analysierten beispielsweise Zellen höherer Passagen, wodurch es bereits zur Verzerrung der Zelleigenschaften im Vergleich zum intraartikulären Milieu kommen konnte [91]. Lee et al. 2014 hingegen fasste den Zeitraum der (sub)akuten Versorgung bis sechs Monate postoperativ, so kann keine Aussage zu Unterschieden der intraartikulären Situation innerhalb der ersten sechs Monate getroffen werden [81]. Zhang et al. analysierte die Zellen mittels FACS, die Zellen wurden hier jedoch nicht durch eine Mehrfachfärbung charakterisiert, wodurch lediglich der Nachweis eines einzelnen Oberflächenantigens möglich ist. Hierdurch ist eine Verzerrung der nachgewiesenen MSC-Zahl möglich [90].

In der vorliegenden Arbeit soll zur Beantwortung der oben genannten Fragestellung zunächst ein Protokoll für die Isolierung der Zellen aus VKB-Biopsien entwickelt werden, um anschließend verschiedene Versuche zum Verhalten der Zellen in Kultur, das Differenzierungs- und Wachstumspotential sowie die Zellmorphologie zur Charakterisierung des gewonnenen Zellmaterials durchführen zu können. So sind Rückschlüsse darauf möglich, ob sich diese Parameter zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ruptur unterscheiden. Die gewonnenen Erkenntnisse können anschließend auf das Potential der Zellen, den Heilungsprozess nach VKB-Rekonstruktion zu unterstützen, übertragen werden. Zur Anwendung kamen verschiedene Zellkultur-, histologische sowie molekularbiologische Methoden. Der zweite Teil der Arbeit soll untersuchen, inwieweit diese VKB-MSCs einen Einfluss auf die histologischen sowie die biomechanischen Eigenschaften eines kollagenbasierten Bandkonstrukts, welches hierbei als Modell für ein VKB-Transplantat dient, haben. Hierzu werden kollagenbasierten Bandkonstrukte hergestellt und anschließend für 21

Tage mit oder ohne Zellen kultiviert. Die Reißfestigkeit der Konstrukte wird durch einen Maximallastversuch beurteilt.

Zusammenfassend soll die vorliegende Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Wie gelingt eine bestmögliche Aufarbeitung der intraoperativ gewonnenen Proben, um die regenerationsfördernden MSCs anschließend unter Berücksichtigung möglicher Störfaktoren hinsichtlich ihrer quantitativen und qualitativen Eigenschaften zu untersuchen?
- Besteht auf zellulärer Ebene ein Zusammenhang zwischen der Latenz zwischen Operation (Probeentnahme) und Rupturzeitpunkt und der Regenerationsfähigkeit des Gewebes?
- Welchen Einfluss üben die isolierten Zellen auf ein kollagenbasiertes Bandkonstrukt aus?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ETHIKVOTUM

Für die biologischen Versuche wurden Zellen aus Biopsien rupturierter humaner Kreuzbänder, welche intraoperativ entnommen wurden, isoliert. Gemäß der Begutachtung durch das Ethikvotum des Universitätsklinikums Würzburg bezüglich der Isolation der primären Zellen bestehen keine Bedenken (Zeichen 182/10).

2.2 MATERIAL

In diesem Kapitel werden die biologischen Biopsiematerialien, die verwendeten Lösungen, Puffer, Medien und Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Kits, Geräte, Verbrauchs- und Labormaterialien sowie Software beschrieben.

2.2.1 BIOLOGISCHES MATERIAL

2.2.1.1 ZELLKULTUR

Für die biologischen Versuche wurden Zellen aus Biopsien rupturierter humaner Kreuzbänder, welche intraoperativ entnommen wurden, isoliert. Die Isolation der Zellen sowie deren Kultivierung in 2D- und 3D-Modellen und Analyse erfolgten anhand neu entwickelter sowie etablierter standardisierter Arbeitsanweisungen (SOP), welche im Abschnitt 2.2 dargestellt werden.

In Tabelle 1 werden die Spenderdaten der Biopsien zusammengefasst, welche von Patienten der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg sowie von Patienten des Sporthopaedicums Straubing (Dr. med. Eichhorn) stammen. Die Entnahme der Biopsien erfolgte intraoperativ im Rahmen der VKB-Rekonstruktion.

Die untenstehenden Proben sind mit in die Auswertung eingegangen. Weitere gewonnene Biopsien konnten nicht mit in die Auswertung aufgenommen werden, da diese entweder für Vorversuche verwendet wurden oder aber aufgrund von Kontamination oder zu geringem Gewicht ausgeschlossen werden mussten.

TABELLE 1: LISTE DER SPENDERDATEN DER VKB-BIOPSIEN

Biopsie	Alter (Jahre)	Geschlecht	Latenz zw. Ruptur und OP
VKB 5	29	m	11 Tage
VKB 6	27	m	5 Monate
VKB 7	28	m	2 Monate
VKB 8	26	m	2 Monate
VKB 9	43	w	2,5 Monate
VKB 11	18	m	2 Monate
VKB 17	26	w	7 Monate
VKB 18	22	m	3,5 Monate
VKB 19	30	w	6 Tage
VKB 20	19	m	5 Monate
VKB 21	37	w	11 Monate
VKB 22	20	m	30 Tage
VKB 23	19	m	3 Monate
VKB 24	27	w	3,5 Monate
VKB 29	25	m	2,5 Monate
VKB 30	50	w	2 Monate
VKB 31	21	m	2,5 Monate
VKB 33	53	w	24 Tage
VKB 34	23	m	31 Tage
VKB 36	25	w	5 Wochen
VKB 37	19	m	7 Wochen
VKB 44	50	w	2 Monate
VKB 47	23	m	30 Tage
VKB 55	10	m	3,5 Monate
VKB 58	23	m	22 Tage

2.2.1.2 BANDKONSTRUKTE

Kollagenfasern, welche zur Herstellung von Bandkonstrukten dienten, wurden aus Rattenschwanzsehnen gesundheitsüberwachter Tiere (gezüchtet von der Fa. Charles River, Sulzfeld, CD-Ratten, Weibchen, älter als 20 Wochen) gewonnen. Das aus den Fasern hergestellte Kollagengel hatte eine Konzentration von 4,5 mg/ml.

2.2.2 LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN

2.2.2.1 ALLGEMEINE LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN

Die verwendeten allgemeinen Lösungen und Chemikalien werden in Tabelle 2 dargestellt.

TABELLE 2: LISTE DER VERWENDETEN LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN

Lösung/Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Albuminfraktion V (pH 7,0)	neoFroxx	1126GR050 Lot 59119063
Alcianblau 1% (pH 2,0 mit Essigsäure)	Morphisto	10126.00500
Alizarinrot S, gepuffert pH 7,0	Morphisto	13154
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Innovatice Diagnostik-Systeme	AL120R500
Ascorbat-2-Phosphat-Lösung	Sigma-Aldrich	A8960-5G Lot #SLBS2107V
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Sigma-Aldrich	A3059-10G
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich	C4384-1G
Dexamethason	Sigma-Aldrich	D4902-25MG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2438-50ML

Lösung/Chemikalie	Firma	Bestellnummer
DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	Gibco™	61965026
Descosept	Dr. Schumacher	82627
Ethylendiamintetraessig- säure (EDTA)	Sigma-Aldrich	E5134
Entellan®	Merck	1.07960.0500
Eosin 1%, wässrig	Morphisto	10177.00500 Lot 18500-21
Essigsäure 100%	Carl Roth	6755.2
Ethanol 96% vergällt	Carl Roth	T171.3
Ethanol vergällt, >99,8%	Carl Roth	K928.4
Fetal Calf Serum (FCS)	Lonza	DE14-801F Lot N° BS226503
β-Glycerophosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich	G9422-50G
Hämatoxylin, sauer (Mayer)	Morphisto	10231
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375-1KG
H ₂ O ₂ 30% (v/v)	Fluka Analytical	95321-500ML
Indomethacin	Sigma-Aldrich	I8280-5G
Insulin solution human	Sigma-Aldrich	I9278-5ML Lot #SLBR0567V
3-Isobutyl-1- Methylxanthine (IBMX)	AppliChem	A0695,0500
ITS Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich	I3146-5ML
Lichtgrün 0,2% (Goldner III)	Morphisto	10267.01000
Kernechtrot 0,1%	Morphisto	10264.00500

Lösung/Chemikalie	Firma	Bestellnummer
NaCl 0,9% (Kochsalzlösung, istonisch)	B. Braun	3570470
Leitungswasser	Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg	
Methanol	Carl Roth	HN41.1
MSCGM-CD™	Lonza	00190632
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid)	Serva	20359
Oil Red O	Sigma-Aldrich	O0625-25G Lot #SLBH0251V
PBS ⁻ (ohne CaCl ₂ und MgCl ₂)	Sigma-Aldrich	D8537-500ML Lot RNBF8142
PBS ⁺ (mit CaCl ₂ und MgCl ₂)	Sigma-Aldrich	D662-500ML Lot RNBF1566
Penicillin-Streptomycin (10000 U/l)	ThermoFisher Scientific	15140122
Phosphormolybdänsäure-Orange G (Goldner II)	Morphisto	11195.00500
L-Prolin	Sigma-Aldrich	P5607-25G
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth	6752.2
Sodiumpyruvat, 100 mM	Invitrogen	11360-039
Recombinant Human TGF-β3	R&D Systems	243-B3-002 Lot #FB4316071
Roticlear	Carl Roth	A538.5
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth	P087.3

Lösung/Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Säurefuchsin-Ponceau (Goldner I)	Morphisto	10366.01000 Lot 13892-8
Salzsäure 5 mol/l	Merck	4.80791.5000
Trypanblau 0,4%	Gibco	15250-061
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379-500ML Lot #SLBW9887
Vollentsalztes Wasser	Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg	
Weigerts Stammlösung A	Morphisto	10225A.01000 Lot 16132-12
Weigerts Stammlösung B	Morphisto	10225B.01000 Lot 16391-3
WST-1 cell proliferation reagent	Roche, Mannheim	11644807001
Xylol	Carl Roth	9713.3

2.2.2.2 MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR

In Tabelle 3 werden die hergestellten Medien und Lösungen für die Kultivierung der isolierten Zellen beschrieben.

TABELLE 3: LISTE DER VERWENDETEN MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Konzentration/Volumen
Adipogenes	Dexamethason	1 µM
Differenzierungsmedium	IBMX	500 µM
	Insulin	1 µg/ml
	Indomethacin	100 µM
	FCS	10% (v/v)
	Pen/Strep in DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	1% (v/v)
Chondrogenes	Ascorbat-2-Phosphat	50 µg/ml
Differenzierungsmedium	Dexamethason	100 nM
	Na-Pyruvat	100 µg/ml
	L-Prolin	40 µg/ml
	ITS	1% (v/v)
	TGF-β3	10 ng/ml
	Pen/Strep in DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	1% (v/v)
Chondroitin-Sulfat-Lösung	Chondroitin-Sulfat In PBS ⁻	5 mg/ml
FACS-Puffer	EDTA	2 mM
	FCS	1% (v/v)
	in PBS ⁻	

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Konzentration/Volumen
GNL (Gelneutralisations- lösung)	DMEM-Medium (2fach konzentriert)	232,50 ml
	HEPES-Lösung (3 M)	7,50 ml
	Chondroitin-Sulfat-Lösung	2,50 ml
	FCS	7,50 ml
HEPES Lösung (3 M)	HEPES in PBS ⁻	715 mg/ml
Kollagenaselösung	Kollagenase-Lyophilisat in DMEM HG	500 U/ml
MSCGM-CD r	FCS in MSCGM-CD™ BulletKit®	2% (v/v)
MTT-Reagenz	MTT in Zellkulturmedium	1 mg/ml
Osteogenes Differenzierungsmedium	Ascorbat-2-Phosphat	50 µg/ml
	β-Glycerophosphat	10 mM
	Dexamethason	100 nM
	FCS	10% (v/v)
	Pen/ Strep	1% (v/v)
	in DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	
PBS ⁻ /EDTA Lösung	EDTA in PBS ⁻	0,54 mM
Tendogenes Differenzierungsmedium	Ascorbat-2-Phosphat	50 µg/ml
	Na-Pyruvat	1% (v/v)
	FCS	10% (v/v)
	TGF-β3	10 ng/ml
	in DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Konzentration/Volumen
Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung	Trypsin (0,5% (10x) mit EDTA, 4 Na) in PBS ⁻ / EDTA	0,05% (v/v)

2.2.2.3 LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN FÜR HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE

Die für histologische und immunhistochemische Färbungen verwendeten Substanzen werden in Tabelle 4 dargestellt.

TABELLE 4: LISTE DER VERWENDETEN LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN FÜR HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE

Chemikalie/Lösung	Zusammensetzung	Konzentration
3% BSA in PBS ⁻	3 g BSA in PBS ⁻	3% (m/v)
Essigsäure (1%)	Essigsäure 100% in VE-Wasser	1% (v/v)
Essigsäure (3%)	Essigsäure 100% in VE-Wasser	3% (v/v)
Eisenhämatoxylin nach Weigert (Gebrauchslösung)	Weigerts Stammlösung A und B 1:1	
Hyaluronidase	in PBS ⁻	2 mg/ml
Oil Red O Färbelösung	Oil Red O in 2-Propanol 99%	5 mg/ml
PBS ⁻ Waschpuffer mit 0,5% Tween-20	10x PBS ⁻ mit Tween in VE-Wasser	10% (v/v) 0,05% (v/v)

2.2.3 ANTIKÖRPER

Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 die in der Arbeit verwendeten Antikörper sowie Isotypen.

TABELLE 5: LISTE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER FÜR DIE FACS-ANALYSE

Anti-körper	Katalog-nummer (Lot)	Wirt	Isotyp	Fluoreszenz-render Farbstoff	Verdünnung $\mu\text{l/ml}$	Hersteller
CD 34	560942	Maus	IgG1 κ	FITC	0,5	BD Pharmingen™
CD 73	561260	Maus	IgG1 κ	PerCP	0,5	BD Pharmingen™
CD 90	560871 (19201)	Maus	IgG1	PE	0,5	BD Pharmingen™
CD105	562408	Maus	IgG1 κ	APC	0,5	BD Pharmingen™

TABELLE 6: LISTE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE

Antikörper	Katalog-nummer (Lot)	Klon	Wirt (Isotyp)	Konzentration (Verdünnung)	Demaskierung	Hersteller
Kollagen I (anti-Hu, anti-Cow)	ab138492	EPR7 785	Hase (IgG)	875 $\mu\text{g/ml}$ (1:1000)	Hyaluro- nidase	Abcam, Cambridge (UK)
Kollagen I (anti-Rat)	BP8002S	-	Hase	1 mg/ml (1:600)	Hyaluro- nidase	Acris, Herford (D)
Kollagen II (anti-Hu)	AF5710 (FF00207)	II- 4C11	Maus (IgG1)	500 $\mu\text{g/ml}$ (1:500)	Hyaluro- nidase	Acris, Herford (D)

TABELLE 7: LISTE ALLER VERWENDETEN ISOTYPEN

Isotyp	Katalog- nummer (Lot)	Wirt	Konzentration (Verdünnung)	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Mouse IgG1 κ Isotype Control	557782	Maus	0,5 µl/ml	BD Phosflow™
APC Mouse IgG1 κ Isotype Control	550854	Maus	2 µl/ml	BD Pharmingen™
Mouse IgG1-PE	A07796	Maus	0,5 µl/ml	Beckman Coulter, Indianapolis (US)
PerCP-Cy™ 5.5 Mouse IgG1 κ Isotype Control	552834	Maus	2 µl/ml	BD Pharmingen™
IgG	#2729/5	Hase	1 mg/ml (1:1143)	Cell Signaling, Danvers (US)
IgG1	X 0931 (93805)	Maus	100 mg/l (1:100)	DAKO Cytomation

2.2.4 ENZYME

Alle Enzyme, die im Rahmen der Arbeit verwendet wurden, werden in Tabelle 8 zusammengefasst.

TABELLE 8: LISTE ALLER VERWENDETEN ENZYME

Enzym	Beschreibung	Hersteller/Katalognummer
Hyaluronidase	Abbau von Hyaluronsäure und Spaltung von Glykosidbindungen in Hyaluronsäure, Chondroitin und Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich H4272
Kollagenase-Lyophilisat	Kollagenase-Lyophilisat NB4 aus Clostridium histolyticum, gebraucht zur Verdauung der VKB-Biopsien zur Isolation verschiedener Zellen	Serva, Heidelberg (D) 17454
Trypsin (0,5% (10x) mit EDTA, 4 Na)	Enzym zum Ablösen adhärenter Zellen von Zellkulturflaschen/ Well-Platten	Gibco 15400-054

2.2.5 KITS

Alle in der Arbeit verwendeten Kits finden sich in Tabelle 9.

TABELLE 9: LISTE ALLER VERWENDETEN KITS

Kit	Beschreibung	Hersteller/Katalognummer
DCS Super Vision 2 2-Schritt HRP-Polymer-Kit mit DAB	Immunhistochemie, DCS Polymer-Enhancer (Link), DCS Polymer-Reagenz (Label), DAB-Konzentrat und DAB-Substratpuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme/ PD000KIT
MSCGM-CD™ BulletKit®	500 ml MSCGM-CD-Medium, MSCGM-CD-Single Quot	Lonza/ 00190632

2.2.6 LABOR- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

In Tabelle 10 und Tabelle 11 sind alle in der Arbeit verwendeten Labor- und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

TABELLE 10: LISTE ALLER VERWENDETEN LABORMATERIALIEN

Labormaterialien	Hersteller
Gewicht 400 g	Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg
Kältehandschuhe	VWR
Kryo-Einfriergeräte, Mr. Frosty	VWR
Kunststoffpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Lochplatte	Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg

Messpipetten aus Glas (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hartenstein
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl)	Eppendorf
Pinzetten (gebogen und gerade)	VWR
Schott Glasflaschen (50 ml, 100 ml, 250 ml)	Duran
Skalpellgriff	VWR
Trichter	Hartenstein
Zellkronen	Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg

TABELLE 11: LISTE ALLER VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Biopsie- und Einbettkassetten, Q Path [®] MacroStar III	VWR
4-well Chamber Slide w/ removable, Permanox	Thermo Scientific™
Cryo.s™, PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One
Deckgläser Microscope Cover Slipes, MENZEL- Gläser 24x60mm#1	Thermo Scientific™
Einmal-Nitrilhandschuhe, white	Hartmann
Einmalspritzen 10 ml	BD Discardit™ II
FACS-Röhrchen 5 ml, 75x12 mm	Sarstedt
Faltenfilter 150 mm	Hartenstein
Filtropur S 0.2	Sarstedt
Kompressen, 5x5 cm, steril	Hartmann
Objektträger MENZEL-Gläser Polysine [®] slides 25x75x1,0 mm	Thermo Scientific™
Pasteurpipetten, Glas	Hartenstein
Pipettenspitzen (0-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) (steril)	nerbe-plus
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Silikonschlauch, Durchmesser 1,0 cm	Hartenstein
Skalpellklingen 22	Bayha
Sterilfilter 0,45 µm	Advangene
Faden, Silkam Kurzfaden, metric 4, USP 1	B.Braun
Zellkulturflaschen 25, 75, 150	TPP®
Zellkulturplatten 6, 24, 96	TPP®
Zellkulturschale 60, 100	TPP®
Zellsieb, EASYstrainer™, 70 µm (steril)	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One

2.2.7 GERÄTE, AUSRÜSTUNG UND SOFTWARE

In Tabelle 12 und Tabelle 13 werden alle Geräte, die verwendete Ausrüstung und Software zusammengefasst.

TABELLE 12: LISTE ALLER GEBRAUCHTEN GERÄTE SOWIE AUSRÜSTUNG

Geräte/Ausrüstung	Hersteller
Abzug	Prutcher Laboratory Systems
Autoklaven:	
Tecnoclav	Biomedis, Giessen (D)
Tischautoklav	Systec, Wettenberg (D)
Varioklav	H+P, Hackermoos (D)
Brutschrank BBD 6220 (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus
Mikroliterpipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer: BD FACSCalibur™	BD Biosciences
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	vacuubrand

Geräte/Ausrüstung	Hersteller
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Kendro
Kühlraum 4 °C	Genheimer
Mikroskope:	
Biorevo BZ-9000	Keyence Deutschland
Axiovert 40C	Carl Zeiss™
EVOS XL	life technologies
Paraffin-Einbettssystem TES Valida	Medite
Photometer Infinite® 200	Tecan
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand
Schlittenmikrotom SM 2010R	Leica
Schüttler:	
Akku-Schüttler KM 2 Akku	Edmund Bühler GmbH
Wippschüttler	VWR
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Spülmaschinen	Miele
Trockenschrank TDO 66	Medite
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen:	
Analysewaage	Kern
Präzisionswaage	Kern
Zentrifugen:	
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Pico 17 Centrifuge	Heraeus
Zwick Z020	Zwick GmbH & Co. KG

TABELLE 13: LISTE DER VERWENDETEN SOFTWARE

Software	Anwendung	Hersteller/ Entwickler
BLZ viewer BLZ analyzer	Lichtmikroskopie	Keyence
FlowJo V10	FACS-Analyse	Becton, Dickinson & Company
Python (Pakete: SciPy.org, Bibliothek: Seaborn (Version: 0.10.1))	Statistische Auswertung, Erstellung von Abbildungen	Python Software Foundation
Office Word 2016 Office Excel 2016 Office Powerpoint 2016	Textverarbeitung, Datenauswertung, Erstellung von Abbildungen	Microsoft Deutschland GmbH
Tecan i-control™ 1.7	Lichtmikroskopie	Tecan

2.3 METHODEN

Am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin wird mit SOPs, also Standard Operating Procedures gearbeitet. Aus diesem Grund sind die bereits etablierten Methodenprotokolle in dieser Arbeit in Form der gültigen SOP dokumentiert. Methoden, welche im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt wurden, sind ausformuliert.

2.3.1 STERILER ARBEITSPLATZ

Entscheidend für ein Gelingen der Arbeit in der Zellkultur im Allgemeinen und insbesondere im Tissue Engineering sind sterile Verhältnisse. Hierfür werden folgende Maßnahmen getroffen.

1. Materialien

- Papiertücher

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Absaugeinrichtung
- Wasserbad

3. Lösungen

- Descosept pur

4. Durchführung

Vor Beginn der Sterilarbeiten:

- Werkbank einschalten,
- mind. 15 min laufen lassen,
- mit Descosept aussprühen und mit Papiertüchern trockenwischen,
- aktuell benötigte Materialien und Geräte können eingebracht werden.

Nach Beendigung der Sterilarbeiten:

- Benutzte Geräte und Materialien aus der Werkbank nehmen, in die Desinfektionsbäder bzw. zum Spülen geben, Arbeitsfläche bei starker

Verschmutzung zuerst mit Wasser und/oder Reinigungsmittel und danach mit Descosept erneut desinfizieren.

Abschluss:

- Nach Abschluss der Arbeiten sicherstellen, ob anschließend an der Bank gearbeitet werden soll.
- Alle nicht ständig benötigten Materialien und Geräte aus der Werkbank nehmen.
- Absaugeinrichtung: wenige ml Descosept ansaugen, bis der Schlauch gespült ist, Arbeitsfläche gründlich mit Descosept desinfizieren.
- Werkbank ausschalten.
- Wasserbad: mind. einmal wöchentlich Wasser wechseln, Wanne reinigen, mit Sprühalkohol auswischen, nur mit VE-Wasser und Desinfektionsmittel wieder befüllen.
- Arbeitsplatz sauber und ordentlich verlassen.

5. Bemerkungen

- Um optimale Strömungsverhältnisse in der Sicherheitswerkbank zu gewährleisten, sollten sich dort nur wenige, aktuell benötigte Materialien und Geräte befinden.
- Die Luftschlitze um den Arbeitsbereich dürfen auf keinen Fall belegt werden.
- Regelmäßige Reinigung der Werkbank nach Geräteanleitung durchführen, zusätzliche Reinigung nach Verschmutzung, z.B. durch Verschütten von Medium bzw. Gefahrstoffen, v.a. wenn Verschmutzungen (durch die Luftschlitze) in den Bereich unterhalb der Arbeitsfläche gelangen.

2.3.2 ZELLKULTURMETHODEN

Die Kultivierung von tierischen sowie pflanzlichen Zellen in einem bestimmten Nährmedium wird als Zellkultur bezeichnet. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Zellteilung und damit zur Vermehrung der Zellen. Die Zellkultur ist ein zentraler Bestandteil der naturwissenschaftlichen Forschung und bietet die Grundlage für viele weiterführende Versuche. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde orientiert an der Vorgehensweise anderer Forschungsgruppen eine Methode zur Isolierung und

Kultivierung von Zellen aus Kreuzbandbiopsien entwickelt, welche im folgenden Abschnitt erläutert wird [97, 116, 137].

2.3.2.1 ISOLATION UND KULTIVIERUNG HUMANER MESENCHYMALER STAMMZELLEN AUS VORDEREN KREUZBÄNDERN

Vor Isolierung humaner Zellen aus den in Tabelle 1 aufgeführten VKB-Biopsien verblieb das Gewebe in sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen in isotonischer Kochsalzlösung bei 4°C.

Zu Beginn der Aufbereitung der Gewebeprobe wurde 1 ml des Transportmediums (isotonische Kochsalzlösung) als Sterilkontrolle in eine 6well-Platte überführt und mit 1 ml Zellkulturmedium im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde das VKB-Gewebe in eine sterile Petrischale gelegt und mehrmals mit PBS⁻ gespült. Es erfolgte die sorgfältige Entfernung von Fett und anderen Geweberesten mit einem Skalpell sowie eine erneute Spülung des restlichen Gewebes mit PBS⁻. Jede Probe wurde nun mit einer sterilen Kompresse abgetrocknet, um das jeweilige Gewicht durch dreimaliges Wiegen auf einer Präzisionswaage bestimmen zu können. Danach wurde das Gewebe nochmals mit PBS⁻ gespült und dann in PBS⁻ in der Petrischale belassen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Biopsie wurde nun mit einem Skalpell in 1-2 mm große Gewebstücke zerteilt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit Kollagenase-Lösung (500 U/ml) bedeckt (5 ml auf 1,5 g Gewebe) und die stehenden Zentrifugenröhrchen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 24 h, um eine vollständige Verdauung des Gewebes zu gewährleisten. Bei kürzerer Inkubationszeit war dies nicht sicher möglich.

Nach Verdau erfolgte das dreimalige Waschen in PBS⁻ und Zentrifugieren (270 xg, 5min) des Gewebe-Kollagenase-Lösungs-Gemischs.

Das Gewebepellet wurde in PBS⁻ resuspendiert, durch ein 70 µm Nylonnetz gefiltert und mit einem Spritzenkolben ausgedrückt. Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend noch zweimal mit PBS⁻ gespült und die Flüssigkeit erneut durch das Netz gefiltert, um möglichst alle Zellen gewinnen zu können. Die gewonnene Suspension

wurde nun erneut zentrifugiert (270 xg, 5 min), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen.

Die isolierten Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die restliche Medium-Zell-Suspension wurde je nach Zellzahl in eine Well-Platte oder Zellkulturflasche überführt und mit einer Aussaatdichte von ca. 50.000 Zellen/cm³ in Stammzellmedium kultiviert. Nach drei bis vier Tagen wurde neues Medium hinzugefügt, um noch nicht adhärenente Zellen nicht abzusaugen. Anschließend erfolgte der Medienwechsel alle drei bis vier Tage.

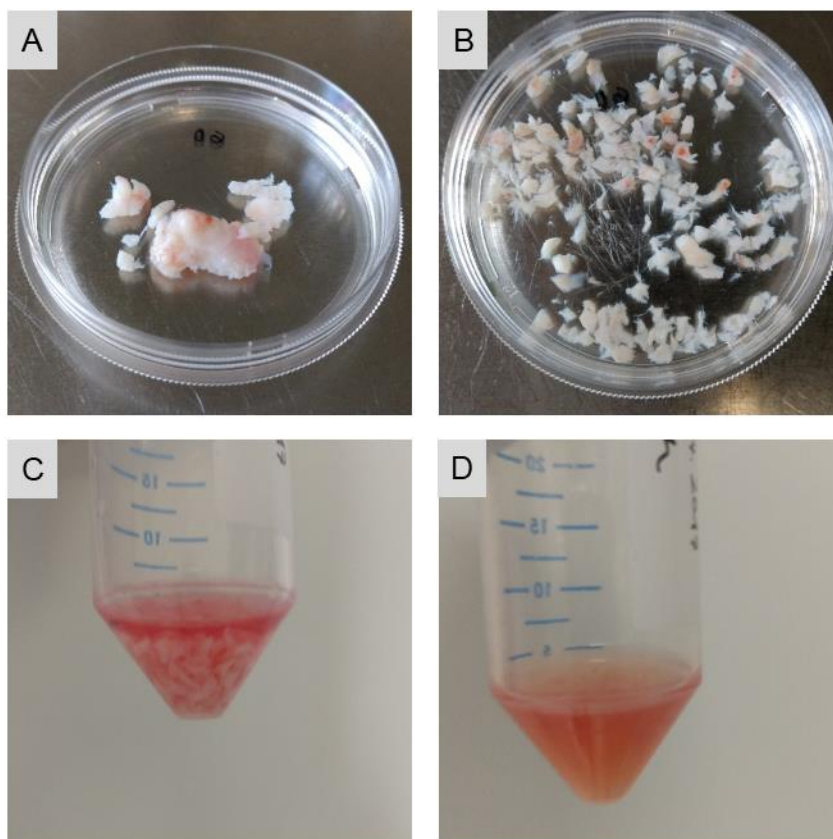


ABBILDUNG 1: ZELLISOLIERUNG AUS EINER INTRAOPERATIV GEWONNENEN VKB-BIOPSIE.

Biopsie **A** nach Entfernung von Fett und anderen Geweberesten, **B** nach Zerkleinerung mit dem Skalpell, **C** in Kollagenase vor und **D** nach 24 h-Verdau.

2.3.2.2 ZÄHLUNG UND VITALITÄTSBESTIMMUNG

Zur quantitativen und qualitativen Beurteilung des gewonnenen Materials musste die Zellzahl sowie die Zellvitalität mittels im folgenden Abschnitt beschriebenen Vorgehen ermittelt werden.

1. Materialien

- Pipettenspitzen
- Probengefäß
- Neubauer-Zählkammer mit Deckgläschen

2. Geräte

- Mikroskop
- Mikropipetten

3. Lösungen

- Trypanblau (0,4%)

4. Durchführung

- Aliquot (mind. 10 µl, max. 50 µl) der Zellsuspension in ein Probengefäß überführen,
- 1:1 mit Trypanblau-Lösung (10-50 ml) mischen und gut resuspendieren,
- 2-5 min inkubieren.
- 10 µl Probengemisch in die Zählkammer geben,
- Deckgläschen luftblasenfrei auf Neubauer-Zählkammer fixieren.
- Auszählen von 4 Großquadranten unter dem Mikroskop: lebende Zellen sind weiß und tote blau.

$$ZZ_{vital} = MW_{vital} * 10^4 * V_{FTB} * V_{Susp.ges.} \quad (4.1)$$

$$ZZ_{gesamt} = (MW_{vital} + MW_{avital}) * 10^4 * V_{FTB} * V_{Susp.ges.} \quad (4.2)$$

$$V_z [\%] = ZZ_{vital} / ZZ_{gesamt} * 100\% \quad (4.3)$$

ZZ_{vital} : Anzahl der vitalen Zellen der Probe

ZZ_{gesamt} : Anzahl der gesamten Zellen der Probe

MW_{vital} : Mittelwert der aus den vier Quadranten ermittelten Anzahl an vitalen Zellen

MW_{avital} : Mittelwert der aus den vier Quadranten ermittelten Anzahl an avitalen Zellen

$V_{Susp.ges.}$: Gesamtvolumen der Zellsuspension

V_Z : Zellvitalität der Probe

$V_{F_{TB}}$: Verdünnungsfaktor

5. Bemerkungen

- Trypanblau ist giftig, deshalb mit Handschuhen arbeiten.
- Zügig arbeiten, denn Zellen sterben nach längerem Kontakt (über 5 min) mit der giftigen Trypanblau-Lösung.
- Zellen, die sich genau auf den Begrenzungslinien der Quadrate befinden, dürfen nicht zweimal gezählt werden. Deshalb zwei Ränder festlegen (z.B. rechts und unten), an denen Zellen mitgezählt werden, die auf diesen Linien liegen. Dafür werden die, die auf den anderen beiden Linien (hier: links und oben) liegen, nicht mitgezählt.

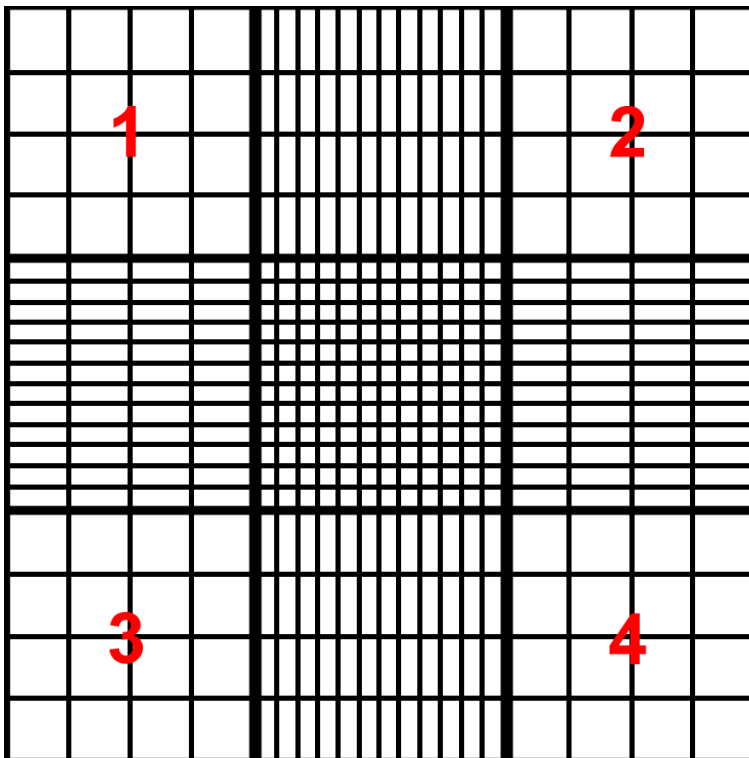


ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER.

Die mit 1-4 nummerierten Quadrate werden ausgezählt, nach oben genannter Formel wird die Anzahl der in Suspension vorhandenen Zellen bestimmt.

2.3.2.3 PASSAGIEREN VON ZELLEN

Sobald die Zellkultur einen Konfluenzgrad von ca. 80-90% erreicht hat, müssen die Zellen abgelöst und in mehrere Kulturgefäße verteilt werden, um eine regelrecht fortgesetzte Proliferation zu ermöglichen.

1. Materialien

- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- Zellkulturflaschen
- Zentrifugenröhrchen
- Neubauer-Zählkammer mit Deckgläschen

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Wasserbad (37°C)
- Pipettierhilfe
- Absaugeinrichtung
- Zentrifuge
- Zellzählgerät
- Mikroskop
- Mikropipetten

3. Lösungen

- Waschpuffer: PBS-/EDTA-Lösung
- Ablösepuffer: Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung (0,05% in PBS-/EDTA)
- zellspezifisches Kulturmedium, ggf. mit Supplementen, Antibiotikum
- FCS
- Trypanblau (0,4%)

4. Durchführung

- Mikroskopische Kontrolle der Zellkultur nach typischen Kriterien (z.B. Morphologie, Zelldichte, Kontaminationen), Passagieren der Zellen bei einer Konfluenz von 80-90%.

- Benötigte Wasch- und Ablöse-Puffer sowie Medium im Wasserbad temperieren (37°C).
- Neue Zellkulturflasche(n) beschriften: Zellart, Passagenzahl, Datum, Namenskürzel – Werkbank vorbereiten.
- Wasch- und Ablöse-Puffer aus dem Wasserbad nehmen.
- Medium absaugen, Vorinkubation der Zellen mit PBS-/EDTA-Lösung für 10 min. Dabei ist der Ablösevorgang der Zellen immer wieder unter dem Mikroskop zu beobachten. Die Zellen müssen vor Zugabe des Trypsins schon teilweise abgekugelt sein, wenn nicht, ist die Inkubation in PBS-/EDTA-Lösung zu wiederholen.
- Medium absaugen, Waschpuffer zugeben (6-well-Platte: 2ml, T25: 4 ml, T75: 10 ml, T150: 15 ml), spülen und absaugen.
- Vorgang ggf. wiederholen (wenn Zellen noch nicht abgekugelt).
- Ablösepuffer zugeben (6-well-Platte: 1 ml, T25: 2 ml, T75: 5 ml, T150: 9 ml), max. 3-5 min im Brutschrank inkubieren, Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrollieren, ggf. durch vorsichtiges Klopfen unterstützen. Einwirkzeiten von Trypsin über 5 min sind unbedingt zu vermeiden, da dann eine Zellschädigung nicht mehr ausgeschlossen werden kann.
- FCS aus dem Wasserbad entnehmen und in die Werkbank stellen, nach dem Öffnen Deckel mit der Öffnung nach unten ablegen.
- Enzymreaktion durch Zugabe FCS (6-well-Platte: 0,1 ml, T25: 0,25 ml, T75: 0,5 ml, T150: 1 ml) stoppen.
- Zellen durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendieren, in Zentrifugenröhrchen überführen.
- Zellkulturflasche jetzt noch einmal mit PBS-/EDTA spülen (6-well-Platte: 2ml, T25: 4 ml, T75: 10 ml, T150: 15 ml) und in das Zentrifugenröhrchen überführen.
- Zellsuspension zentrifugieren: 1200 rpm, 5 min.
- Überstand vorsichtig absaugen, Pellet in Medium resuspendieren.
- Aliquot (mind. 10 µl, max. 50 µl) zur Zellzählung abnehmen.
- Zellzählung durchführen.

- Zellen in gewünschter Konzentration in neue Zellkulturflaschen aussäen (Gesamtvolumina: T25: 2-3 ml, T75: 6-9 ml, T150: 18-20 ml), Medium entsprechend in der Zellkulturflasche vorlegen.

5. Bemerkungen

- Deckel und Flaschenrand sauber und trocken halten, besonders nach der Temperierung im Wasserbad (um Kontaminationen zu vermeiden).
- Zur Passagenzahl: beim Passagieren von Zellen wird immer eine Passage dazu addiert.

2.3.2.4 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Nach dem Passagieren der Zellen können diese entweder einem bestimmten Versuch zugeführt oder für spätere Versuche eingefroren und im Verlauf gegebenenfalls wieder aufgetaut werden.

1. Materialien

- Sterile Glaspipetten
- Steriles Zentrifugenröhrchen, 50 ml
- Sterile Kryoröhrchen 1,8 ml
- Kälteschutzhandschuhe, Schutzbrille, ggf. Eisbad zum Transport

2. Geräte

- Absaugeinrichtung
- Gefrierschrank (-80°C)
- Mikroskop
- Mr. Frosty
- Neubauer-Zählkammer mit Deckgläschen
- Pipettierhilfe
- Sicherheitswerkbank
- Stickstofftank (-180 °C)
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Mikropipetten

3. Chemikalien

- DMSO (Sigma, Bestell Nr. D8418-50ML)

4. Lösungen

- PBS-/EDTA
- 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung
- Zellspezifisches Kulturmedium
- FCS

5. Durchführung

Einfrieren der Zellen:

- Kryoröhrchen beschriften: Zelltyp, Passagezahl (entsprechend der Flasche, s.a. Bemerkungen!), Menge der Zellen/ ml, Namenskürzel und Datum.
- Zellen nach Protokoll ablösen und Zellzahl bestimmen.
- Zellzahl auf 1 Mio. Zellen/ ml in kaltem Zellkulturmedium einstellen.
- 10% DMSO und FCS in der Zellsuspension einstellen und 1 ml/ Kryoröhrchen aliquotieren.
- Das Einfrierröhrchen sorgfältig verschließen, sofort in den Mr. Frosty einsortieren und im -80°C-Gefrierschrank lagern
- Nach 24h aus Mr. Frosty nehmen und in Stickstofftank überführen, alternativ mehrere Tage bis Wochen bei -80°C lagerbar.
- Menge und Standort der Röhrchen in die Liste auf Q:\Labor\Übersichten\Cryotank_Lagerplan eingefrorene Zellen eintragen.

Auftauen der Zellen:

- Zellspezifisches Medium im Wasserbad temperieren (37°C).
- 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml des vorgewärmten Mediums bereitstellen
- Zellen aus dem Gefrierschrank (-80°C → Kälteschutzhandschuhe!) oder Stickstofftank entnehmen und auf Eisbad transportieren.
- Rasch ins Wasserbad überführen und schwenkend so weit auftauen, dass nur noch ein kleines Eisklumpchen erkennbar ist.
- Zellsuspension mit Hilfe der Mikropipette in das vorgelegte Medium im Zentrifugenröhrchen überführen, Zentrifugieren (270 xg, 5 min).

- Je nach Zelltyp in entsprechende Flasche möglichst luftblasenfrei aussäen.
- Beim Herausnehmen eines Röhrchens dieses auf der Liste Q:\Labor\Übersichten\Cryotank_Lagerplan streichen.

6. Bemerkungen

- > 1% DMSO wirkt bei Raumtemperatur zelltoxisch, d.h. Zellen mit DMSO stets zügig verarbeiten, d.h. rasch wegfrieren bzw. nach dem Auftauen rasch verdünnen und zentrifugieren.
- DMSO verhindert als Gefrierschutzmittel während des Einfrierprozesses die Bildung von Eiskristallen, die Zellorganelle zerstören können und zum Absterben der Zellen führen.
- Zur Passagenzahl: Beim Passagieren von Zellen wird immer eine Passage dazu addiert. Das Einfrieren ist hier eine Form der Zwischenlagerung, d.h. die kontinuierliche Kultur wird unterbrochen. Deshalb wird erst bei Wiederaufnahme der Kultivierung nach dem Einfrieren bei der Passagenzahl weitergezählt.
- Kontaminationsgefahr beim Öffnen des Kryoröhrchens. Deshalb Deckel und Flaschenrand sauber und trocken halten, besonders nach Temperierung im Wasserbad.

2.3.3 ADIPOGENE, OSTEOGENE UND CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG HUMANER

MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Zur Definition der MSCs als solche kann der Nachweis ihres multipotenten Differenzierungspotentials in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten erbracht werden. Hierzu erfolgt die Kultivierung der Zellen in speziellen Differenzierungsmedien. Dieser Versuch wurde in jeder der drei Probengruppen an n=3 Biopsien getrennt voneinander durchgeführt, um jeweils einzeln das Vorkommen von hMSCs in der Zellpopulation nachweisen zu können. Die verwendeten Zellen wurden hierbei in P1 ausgesät.

1. Materialien

- Sterile Glaspipetten
- Steriles Zentrifugenröhrchen, 15 ml
- Steriles Reaktionsgefäß
- 4well-Chamberslides Permanox®

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Pipettierhilfe
- Absaugeinrichtung
- Zentrifuge
- Mikroskop
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)

3. Lösungen

- Differenzierungszusätze
 - 50 mg/ml Ascorbat-2-Phosphat-Lösung
 - 1 mM Dexamethason
 - 1 M β-Glycerophosphat
 - 500 mM IBMX
 - 100 mM Indomethacin
 - 100 ng/ml Pyruvat
 - 40 ng/ml L-Prolin
 - 10 mg/ml Insulin
 - ITS +1
 - 10 µg/ml TGF-β3
- DMEM HG
- FCS
- hMSC-Kulturmedium: MSCGM-CD + 2% FCS

Differenzierungsmedien werden stets in solcher Menge angesetzt, dass sie möglichst in einer Woche aufgebraucht werden. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Medien kann in der Materialliste unter 2.2.2 nachvollzogen werden.

4. Durchführung

- Sterilbank anschalten.
- MSCs ablösen und zählen.

Osteogene bzw. adipogene Differenzierung in 4well-Chamberslides Permanox®:

- Pro Ansatz werden 2 Differenzierungsansätze (Diff.) und 2 Negativkontrollen (NK) kultiviert.
- Pro Kammer werden 100.000 Zellen in 1 ml MSCGM-CD + 2% FCS ausgesät und bis zum Erreichen einer 100%igen Konfluenz kultiviert.
- **Zu beachten:** Für die Negativkontrollen wird weiterhin das Stammzellmedium verwendet und für den Differenzierungsansatz das entsprechende (osteogene bzw. adipogene) Differenzierungsmedium.
- Für die **osteogene Differenzierung** werden MSCs 28 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert.
- Für die **adipogene Differenzierung** werden MSCs 14 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert.
- Der Medienwechsel muss 3x pro Woche durchgeführt werden.

Chondrogene Differenzierung in Pelletkultur

- Die chondrogene Differenzierung wird in sterilen Zentrifugenröhrchen durchgeführt.
- Es werden mindestens ein Differenzierungsansatz sowie eine Negativkontrolle benötigt.
- 250.000 Zellen pro Ansatz in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugieren (270 xg, 5 min).
- Über Nacht im Brutschrank inkubieren.
- Am nächsten Tag das Aggregat mit chondrogenem Differenzierungsmedium überschichten.
- **Zu beachten:** Für die Negativkontrolle wird das chondrogene Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 verwendet und für den Differenzierungsansatz das chondrogene Differenzierungsmedium mit TGF- β 3.

- TGF- β 3 (Stock-Konzentration 10 mg/ml) wird vor jedem Medienwechsel frisch zum Medium zugegeben (1 μ l TGF- β 3 auf 1 ml chondrogenes Differenzierungsmedium). Dabei immer für alle Differenzierungsansätze Medium gesamt ansetzen.
- Für die chondrogene Differenzierung werden die Pellets 21 Tage mit dem Differenzierungsmedium kultiviert.
- Der Medienwechsel sollte 2x pro Woche durchgeführt werden.

5. Bemerkungen

- Wird nicht alles TGF- β 3 aus einem Aliquot benötigt, dann nicht wieder einfrieren, sondern bis zum nächsten Medienwechsel im Kühlschrank (4 °C) lagern.
- Bei der chondrogenen Differenzierung wird von Beginn an das Differenzierungsmedium (nicht das Stammzellmedium) verwendet.

Im Anschluss an die Kultivierung erfolgt der Nachweis von Lipidtropfen (adipogene Differenzierungsansätze) an Tag 14 mittels Ölrotfärbung (Abschnitt 3.6.4) sowie von Kalziumhydrogenphosphat (osteogene Differenzierungsansätze) an Tag 28 mittels Alizarinrot-S-Färbung (Abschnitt 3.6.5)

Die chondrogenen Pellets sowie deren Negativkontrollen wurden an Tag 21 in 4% PFA fixiert sowie in Paraffin eingebettet wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben. Anschließend wurden bei den angefertigten Gewebeschnitten eine Alcianblaufärbung sowie eine immunhistologische Färbung von Kollagen II durchgeführt, wie in Abschnitt 3.6.3 sowie 3.7 erläutert.

2.3.4 WACHSTUMSPOTENTIAL UND ZELLVIABILITÄT

Zur genaueren Charakterisierung der isolierten Zellen wurden Wachstumskurven angelegt sowie eine Viabilitätstestung mittels WST-1 zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten in Passage 0 durchgeführt.

Die Zellviabilität in den Bandkonstrukten nach 21 Tagen Kultur wurde mittels eines MTT-Tests bestimmt.

2.3.4.1 WACHSTUMSKURVE IN 24WELL-PLATTE

Wachstumskurven dienen dazu, das Wachstumsverhalten der isolierten Zellen genauer beurteilen zu können. Hierfür wurden die Zellen unmittelbar nach Isolation in einer 24well-Platte als vier Dupletts oder Tripletts ausgesät und kultiviert. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Kultivierung wurde die Zellzahl als Mittelwert bestimmt. Begonnen wurde mit Zeitpunkt 1 jeweils, sobald einige adhärente Zellen mikroskopisch nachweisbar waren.

1. Materialien

- 24well-Platte
- sterile Glas- und Pasteurpipetten
- sterile Pipettenspitzen
- Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Zentrifuge
- Brutschrank (37°C, 5% CO₂)
- Wasserbad (37°C)
- Pipettierhilfe
- Multistepper oder Mehrkanalpipette
- Absaugeinrichtung
- Mikropipetten
- Neubauer-Zählkammer und Deckglas

3. Lösungen

- Differenzierungszusätze
- PBS-/EDTA
- 0,05% Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung
- FCS
- Zellspezifisches Kulturmedium
- Trypanblau

4. Durchführung

Tag 1

- Zellen ablösen, Zellzahl bestimmen.
- Die pelletierten Zellen mit entsprechendem Kulturmedium aufnehmen und z.B. auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml einstellen.
- Diese dann 1:10 verdünnen = 1×10^6 Zellen/10 ml (= 1×10^5 Zellen/ml; $200 \mu\text{l} = 2 \times 10^4$ Zellen; $50 \mu\text{l} = 5 \times 10^3$ Zellen).

Aussaat in 24well-Platte:

- 5×10^3 Zellen/ $50 \mu\text{l}$ Kulturmedium,
- Platte mit Zellen besiedeln (siehe Abbildung 3).
- Wells 1-3 mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums überschichten (Ansetzen von Triplikaten).
- Wells 4-6 sind optional, je nachdem wie die Zellzahl ausfällt: Falls genügend Zellen vorhanden sind, können mehr als 3 Wells ausgesät werden.

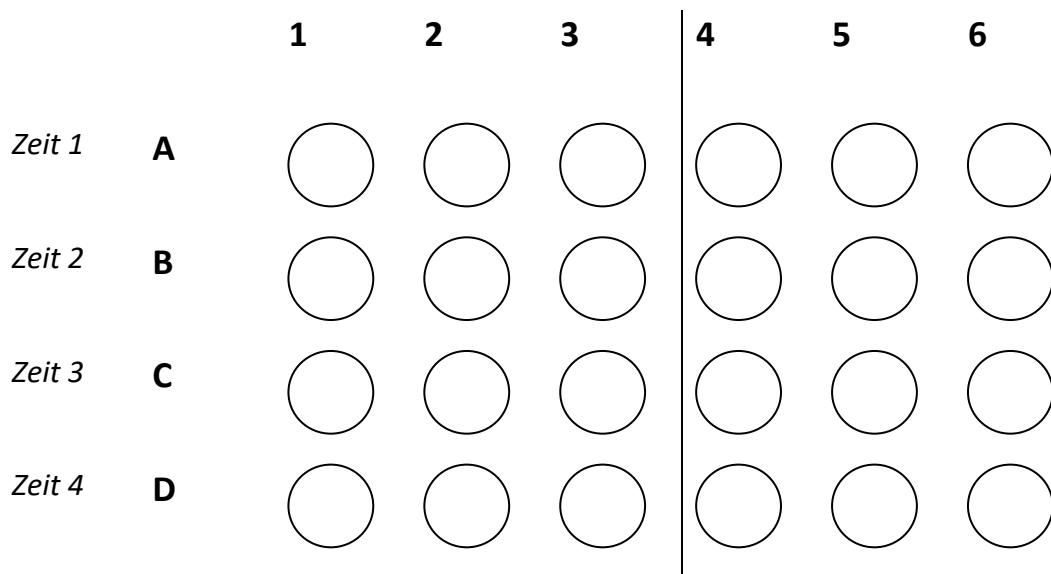


ABBILDUNG 3 WELLPLATTE ZUR BESIEDLUNG ZUR ERSTELLUNG EINER WACHSTUMSKURVE

- Inkubation bei 37°C , 5% CO_2 bis zum jeweiligen Analysezeitpunkt.

Analysezeitpunkte 1 bis 4

- Zellen einer Reihe (mind. 3 Wells - Triplikate) ablösen, Zellzahlbestimmung
dazu:
 - Medium absaugen,
 - mit 1 ml PBS/EDTA je Well spülen,
 - 500 µl Trypsin/EDTA je Well zugeben, 3 min im Brutschrank inkubieren
 - mit 100 µl FCS abstoppen, resuspendieren, in Zentrifugenröhrchen überführen.
 - Wells mit je 500 µl PBS/EDTA nachspülen, in Zentrifugenröhrchen überführen,
 - zentrifugieren (270 xg, 5 min).
 - Je nach Pelletgröße in je 10-100 µl Puffer/Medium und Trypanblau resuspendieren.
 - Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit Neubauer-Zählkammer.

2.3.4.2 MTT ZELLVIABILITÄTSTEST

Zur Untersuchung der Viabilität der Zellen in den Bandkonstrukten wurde ein MTT Zellviabilitätstest nach standardisierter SOP durchgeführt. Hierfür wurden die in der biomechanischen Messung verwendeten Konstrukte verwendet, die durch den Versuch zerrissen und ca. 3 Stunden auf Raumtemperatur in DMEM HG gelagert wurden. Die Konstrukte waren dementsprechend unsteril.

1. Materialien

- Wägeschälchen
- Sterile Pipetten und Pasteurpipetten
- Sterilfilter 0,45 µm
- Einmalspritze
- 2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril

2. Geräte

- Waage
- Vortexer

- Pipettierhilfe
- Fotoapparat

3. Chemikalien und Lösungen

- MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) (SERVA, 20395)

Ansetzen des MTT-Reagenzes:

- 60 mg MTT in 20 ml VE-Wasser lösen (= 3 mg/ml),
 - Sterilfiltrieren,
 - 2 ml-Aliquots bei -20°C lagern.
- Zellspezifisches Medium
 - VE-Wasser

4. Durchführung

- Angesetztes MTT-Reagenz (3 mg/ml) auftauen lassen und vortexen.
- 2 ml MTT-Reagenz mit 4 ml zellspezifischem Medium im Zentrifugenröhrchen mischen (= 1 mg/ml).
- Zellen mit MTT-Gemisch überschichten,
- 90 min im Brutschrank inkubieren,
- Reagenz absaugen, mit PBS⁺ waschen,
- Fotodokumentation

2.3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Eine weitere Methode, um multipotente Stammzellen als solche zu identifizieren, ist der Nachweis eines charakteristischen Oberflächenantigenmusters, wie in Abschnitt 1.3 erläutert. Da das zur Verfügung stehende BD FACSCalibur™ nur vier verschiedene Farben gleichzeitig messen kann, musste eine Auswahl an Oberflächenantigenen getroffen werden. In dieser Arbeit sollten hMSCs insbesondere von CD34+ vaskulären Stammzellen aus dem VKB abgegrenzt werden, weshalb die Zellen neben den drei typischerweise detektierbaren Oberflächenantigenen CD90, CD73 und CD105 zusätzlich für CD34 gefärbt wurden, welcher bei den MSCs nicht vorhanden sein soll [92, 122, 138].

Es wurden wiederum Zellen direkt nach Isolation (P00) verwendet, um den Anteil der hMSCs in der Biopsie selbst möglichst gut abbilden zu können. Die isolierten Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^5 bis 5×10^5 pro 100 μl FACS-Puffer eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit den entsprechenden primären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bzw. Isotypen jeweils als Vierfachfärbung für 60 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und in 500 μl FACS-Puffer resuspendiert.

2.3.6 HERSTELLUNG UND KULTIVIERUNG VON BANDKONSTRUKTEN

Um beurteilen zu können, inwieweit die isolierten Zellen die Einheilung einer Kreuzbandplastik unterstützen können, wurde ein *in vitro* Bandkonstrukt-Modell entwickelt.

2.3.6.1 GEWINNUNG VON KOLLAGENFASERN AUS RATTENSCHWÄNZEN

Zur Gewinnung von Kollagenfäden wurden Rattenschwanzsehnen gesundheitsüberwachter Tiere (gezüchtet von der Fa. Charles River, Sulzfeld, CD-Ratten, Weibchen, älter als 20 Wochen) verwendet.

1. Material

- Rattenschwänze
- Skalpellhalter mit Skalpellklingen
- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml
- Hackenpinzette
- Sterile Petrischalen 15 cm
- Klemmscheren
- sterile Metallwanne
- 1l-Becherglas

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank

- Pipettierhilfe

3. Lösungen

- PBS⁻
- 70% EtOH

4. Durchführung

- Sterile Metallwanne mit PBS⁻ befüllen,
- Rattenschwänze einlegen und auftauen lassen.
- Rattenschwänze für 2 min in ein 1 l-Becherglas mit 400 ml 70% EtOH einlegen.
- Rattenschwänze einzeln mit einer Pinzette entnehmen, in eine Petrischale ablegen und die Schwanzhaut mit einem Skalpell der Länge nach mindestens zu zwei Drittel aufschneiden.
- Schwanz am Ende der Schnittstelle mit einer Hackenpinzette festhalten, die Haut mit einer zweiten Hackenpinzette abziehen und entsorgen.
- Die abgehäuteten Schwänze in eine zweite Metallwanne mit PBS⁻ ablegen.
- Die Schwänze mit einer Pinzette am Schwanzende halten und 2-3 cm vom Schwanzende entfernt mit einer Klemmschere abklemmen, drehen und die Sehnen herausziehen.
- Die isolierten Sehnen vom Schwanzstück mit einem Skalpell abtrennen und in einer Petrischale mit PBS⁻ Puffer sammeln, das Schwanzstück verwerfen
- Den Vorgang wiederholen, bis alle Sehnen aus dem Schwanz herausgezogen sind.
- Isolierte Sehnenstücke dreimal mit PBS⁻ Puffer spülen. Den Puffer mit einer Pipette vorsichtig absaugen und dabei die Sehnenstücke mit einer Pinzette zurückhalten, damit sie nicht mit abgesaugt werden.
- Die Fasern 1x mit 70% EtOH spülen, vorsichtig absaugen und erneut 70% EtOH zugeben.
- 10 min inkubieren zum Zweck der Desinfektion,
- anschließend dreimal mit PBS⁻ Puffer spülen.
- 5 ml des letzten Spül-Puffers aus der Petrischale abnehmen und in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren (für Sterilitätstest).

Bis zur weiteren Verarbeitung (Herstellung von Kollagengel oder von Bandkonstrukten) werden die gewonnenen Fasern entweder „trocken“ bei -80°C eingefroren oder bis zu 7 Tage in sterilem PBS⁻ mit 1% Pen/Strep bei 4°C gelagert.

2.3.6.2 HERSTELLUNG VON KOLLAGENGEL AUS RATTENSCHWANZfasERN

Zur Herstellung von Kollagengel werden zuerst Kollagenfasern aus Rattenschwänzen gewonnen wie in 3.5.2 erläutert und wie im Folgenden beschrieben weiterverarbeitet.

1. Material

- Isolierte Rattenschwanzfasern (3.5.1)
- sterile Glaspipetten
- sterile Pasteurpipetten
- sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml
- sterile Pinzette
- Sterile Petrischalen 15 cm
- 250 ml Glasflasche
- sterile Spinnerflasche
- 1 l-Becherglas
- sterile Zentrifugenbecher
- sterile Magnetrührstäbchen

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Pipettierhilfe
- Zentrifuge
- Rührreaktor
- Magnetrührer
- Analysenwaage

3. Lösungen

- sterile Essigsäure (0,1%)

4. Durchführung

- Restliches PBS⁻ absaugen.

- Fasern in einer Petrischale wiegen.
- 500 ml Essigsäure in Spinnerflasche vorlegen.
- Präparierte Fasern mit einer Pinzette in die Spinnerflasche überführen.
- Sterilen Rührkern zugeben und Flasche verschließen.
- Rührreaktoraufsatz aufsetzen.
- Im Kühlraum bei 4°C rühren lassen, bis makroskopisch keine Faserreste oder transparente Klumpen mehr erkennbar sind. (2-3 Wochen).
- Kollagenlösung in die Zentrifugenbecher dekantieren.
- 1 h bei 4°C mit 17.700 xg zentrifugieren.
- Kollagenlösung aus allen Zentrifugenröhrchen in einer Glasflasche sammeln und 20 min auf dem Magnetrührer rühren lassen, Flasche mehrmals vom Rührer nehmen und kräftig schütteln.
- Probe für die Kollagengehaltsbestimmung entnehmen.
- Ggf. fehlende Essigsäuremenge zum Kollagen zugeben.
- 20 min auf dem Magnetrührer rühren lassen, Flasche mehrmals vom Rührer nehmen und kräftig schütteln.
- In 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotieren (zwischen 5 und 10 ml Aliquots) und bei -20°C bis zum Gebrauch lagern.

5. Bemerkungen

Sobald ein Aliquot der Kollagenlösung aufgetaut ist, bei 4°C lagern, innerhalb von 10 Wochen aufbrauchen und nicht wieder einfrieren!

2.3.6.3 HERSTELLUNG VON BANDKONSTRUKTEN AUS KOLLAGENFÄDEN

Das im Folgenden beschriebene Vorgehen orientiert sich an einer Vorarbeit aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg von Klug [139]. Die für das Knüpfen der Bandkonstrukte verwendeten Kollagenfasern mussten gewisse Mindestanforderungen erfüllen. Die Länge der Fasern betrug 8-12 cm. Zudem mussten die einzelnen Fasern einer orientierenden biomechanischen Testung mit einer Krafteinwirkung von 3,94 N standhalten. Hierzu wurde die Faser an beiden Enden festgehalten und mit ihr ein Gewicht von 400 g für 2 s hochgehoben. Wichtig war

zudem, dass die Fasern stets mit PBS⁻ benetzt waren, um eine irreversible Schädigung durch Austrocknung zu vermeiden.

Zur Herstellung eines Bandkonstrukts wurden die Einzelfäden zuerst mittels des sogenannten Blutknotens zu einem längeren Faserstrang von ca. 60 cm miteinander verknüpft. Die biomechanischen Eigenschaften dieses Knotens waren denen des Dreifachknotens in der Vorstudie von Klug überlegen gewesen [139]. Um einen möglichst gleichmäßigen Faserstrang zu erhalten und einen optimalen Halt des Knotens zu gewährleisten, war es wichtig, auf eine möglichst große Homogenität der einzelnen Fasern zu achten. Zur weiteren Qualitätskontrolle wurden die geknüpften Knoten wie die Einzelfasern mit einer orientierenden biomechanischen Testung überprüft, indem erneut ein Gewicht von 400 g für 2 s angehoben wurde.

Um ein bandähnliches Konstrukt herzustellen, wurde ein sogenannter Reiter verwendet, welcher aus zwei starren Holmen mit zwei querverlaufenden parallelen Streben im Abstand von 3 cm besteht (siehe Abbildung 4).

Auf diesen Reiter wurde der lange Faserstrang acht Runden gewickelt und die beiden Enden mittels eines vierfachen Einzelknotens miteinander verbunden. Das Ergebnis war ein Bandkonstrukt von 3 cm Länge (siehe Abbildung 4).

Für die weiteren Versuche wurden nur Bandkonstrukte verwendet, welche einen Mindestdurchmesser von 2,5 mm vorwiesen. Dies wurde mit einer Lochplatte überprüft. Die Bandkonstrukte wurden in einem sterilen, mit PBS⁻ gefüllten Zentrifugenröhrchen durch zwei Surgical Loops in der Form stabilisiert gelagert und vor Kultivierung mit 25 kGy gammasterilisiert (extern, BBF Sterilisationsservice GmbH, Kernen-Rommelshausen).

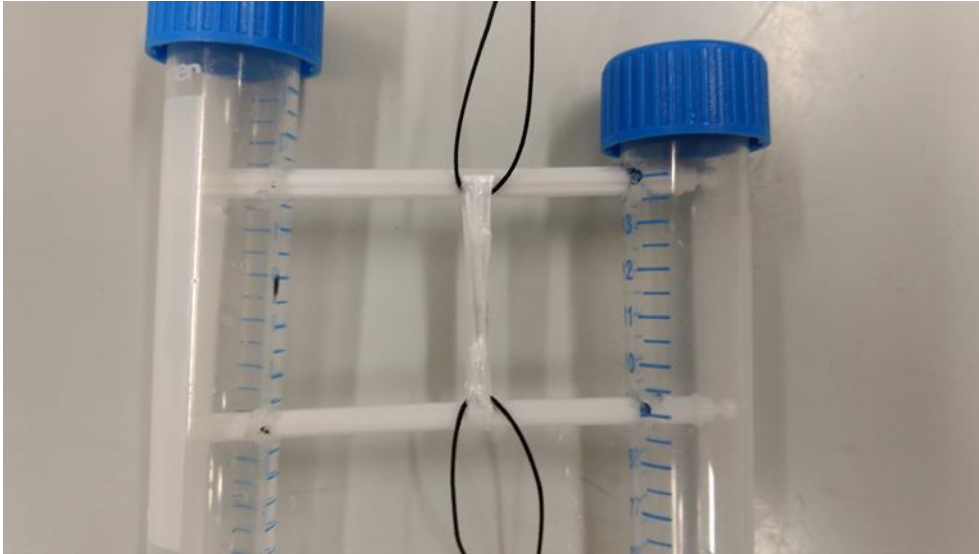


ABBILDUNG 4: GEKNÜPFTES KOLLAGENFASERBAND AUF EINEM SOGENANTEN REITER

2.3.6.4 BESIEDELUNG UND KULTIVIERUNG DER BANDKONSTRUKTE MIT KOLLAGENGEL MIT UND OHNE ZELLEN

Mittels dieses Versuches sollte beurteilt werden, inwieweit die isolierten VKB-MSCs mit Kollagen I, dem Hauptbestandteil eines nativen VKBs, interagieren. Hierzu wurden zwei Gruppen gebildet, die eine Hälfte der Konstrukte wurde mit Zellen, die andere Hälfte ohne Zellen kultiviert. Bei den Zellen handelte es sich um die isolierten VKB-MSCs dreier Spender aus der Probengruppe II in P2 (siehe Tabelle 24). Die Zellzahl des Zellpools betrug insgesamt 8.940.000 Zellen.

2.3.6.4.1 VERSUCHSAUFBAU

Zur Vorbereitung wurden ein halbrohrförmiger Silikonschlauch als Begrenzung für das Kollagengel sowie je zwei Zellkronen zur Aufspannung des Konstrukts in einer Petrischale (15 cm) platziert (siehe Abbildung 5).

Das aufgetaute Kollagengel wurde auf vier Zentrifugenröhrchen (50 ml) à 6 ml aufgeteilt, bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert und direkt vor Verwendung im Verhältnis 2:1 mit Gelneutralisationslösung (GNL) gemischt, um einen neutralen pH-Wert zu erreichen. Die Kollagenkonzentration der Kollagen I-GNL-Mischung betrug anschließend folglich 3 mg/ml. Für den Ansatz mit Zellen wurde jeweils die Hälfte der

Zellen in je 3 ml GNL resuspendiert. Bei den notwendigen Suspensions-Resuspensions-Vorgängen musste besonders auf die Vermeidung von Luftblasen geachtet werden.

Nun wurde immer 6 ml Kollagengel mit 3 ml GNL mit oder ohne Zellen gemischt, anschließend unmittelbar je ca. 1 ml der Kollagen I-GNL-Mischung (mit oder ohne Zellen) auf einem Silikonschlauch verteilt sowie ein Konstrukt daraufgelegt und leicht eingedrückt. Anschließend wurde erneut eine Kollagen I-GNL-Mischung (mit bzw. ohne Zellen) angefertigt und je 1 ml auf dem Konstrukt verteilt. Hierbei war auf ein schnelles, präzises Arbeiten zu achten, um die Kollagen I-GNL-Mischung in noch flüssigem Zustand vor dem Gelieren verarbeiten zu können.

Das vollständige Gelieren des Hydrogels erfolgte bei einer 90-minütigen Inkubation bei 37° im Brutschrank.

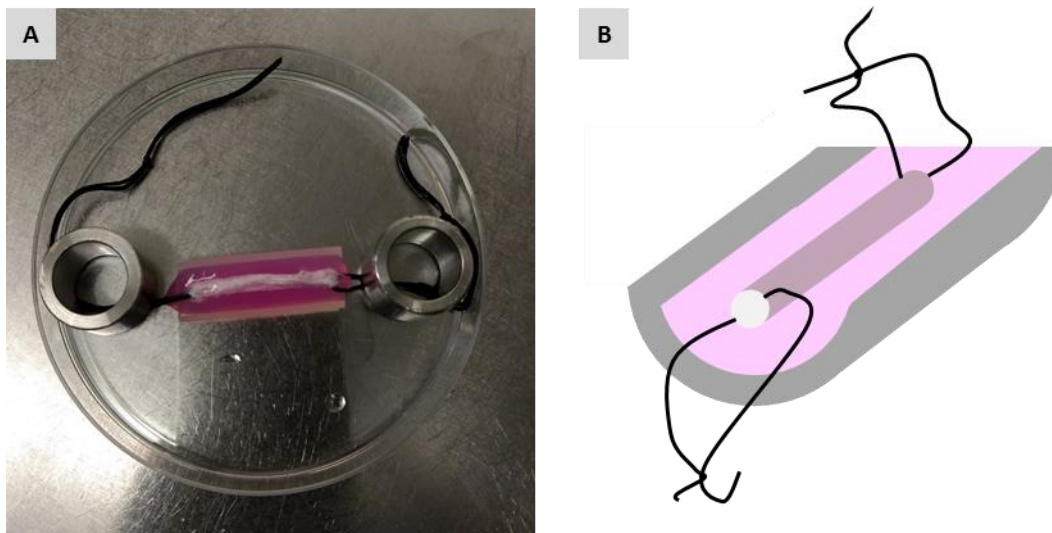


ABBILDUNG 5: AUFBAU DER BANDKONSTRUKTE

A Foto, **B** schematische Darstellung.

2.3.6.4.2 KULTIVIERUNG

Anschließend wurden die Konstrukte für insgesamt 21 Tage mit tendogenem Differenzierungsmedium [140] (siehe 2.2.2) bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Hierzu wurden jeweils zwei Konstrukte der gleichen Gruppe (mit bzw. ohne Zellen) nach Gelieren des Hydrogels ohne Zellkronen in eine kleinere Petrischale (6 cm) überführt und mit 12 ml Medium überschichtet, sodass die Konstrukte gerade so mit

Medium bedeckt waren. Ein Medienwechsel wurde alle drei bis vier Tage durchgeführt.

2.3.7 HISTOLOGIE

Zur genaueren Darstellung von Gewebestrukturen, Zellen sowie Matrix wurden histologische Färbungen verschiedener Präparate durchgeführt. Wenn nicht anders deklariert, erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Entellan® und Deckgläschen.

2.2.7.1 VORBEREITENDE MAßNAHMEN

Das Gewebe muss für die mikroskopische Analyse vor der Färbung in einen lichtdurchlässigen Zustand gebracht werden. Hierzu wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und anschließend mit dem Mikrotom dünne Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt. Die Einbettung der chondrogenen Pellets wurde nach PFA-Fixierung (60 min) nach Protokoll (Tabelle 14) per Hand durchgeführt, die Einbettung der Bandkonstrukte erfolgte nach PFA-Fixierung (60 min) automatisiert mit einem Einbettautomaten nach folgendem Protokoll (Tabelle 15).

TABELLE 14: PARAFFINEINBETTUNG PER HAND

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
Leitungswasser	1-2 h	Waschen von Fixierungslösung
50% (v/v) EtOH	ü. N.	Dehydrierung
70% (v/v) EtOH	1 h	
90% (v/v) EtOH	1 h	
96% (v/v) EtOH	1 h	
Isopropanol I	1 h	
Isopropanol II	1 h	
Isopropanol/Xylol 1:1	1 h	Elimination des Alkohols,
Xylol I	1 h	Inkubation bei Raumtemperatur
Xylol II	1 h	
Paraffin I	ü. N.	Paraffineinbettung,

Paraffin II	2 h	Inkubation bei 60°C im Wärmeschrank für komplette Infiltration
-------------	-----	--

TABELLE 15: PARAFFINEINBETTUNGSPROTOKOLL DES EINBETTAUTOMATEN

Lösung	Zeit	Prozess+ Bemerkung
Leitungswasser	1-2 h	Waschen von Fixierungslösung
50% (v/v) EtOH	ü. N.	Dehydrierung
70% (v/v) EtOH	1 h	
90% (v/v) EtOH	1 h	
96% (v/v) EtOH	1 h	
Isopropanol I	1 h	
Isopropanol II	1 h	
Isopropanol/Xylol 1:1	1 h	Elimination des Alkohols
Xylol I	1 h	Inkubation bei Raumtemperatur
Xylol II	1 h	
Paraffin I	3 h	Paraffineinbettung
Paraffin II	3 h	

Vor dem Färben mussten die Schnitte entparaffinisiert und rehydriert werden. Hierzu wurde für alle Färbungen, wenn nicht anders erwähnt, das in Tabelle 16 beschriebene Protokoll verwendet.

TABELLE 16: ENTPARAFFINISIERUNG UND REHYDRIERUNG MITTELS ABSTEIGENDER ALKOHOLREIHE

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
	60 min	Inkubation bei 60°C im Wärmeschrank zum Schmelzen des Paraffins
Roticlear I	10 min	Entparaffinisierung
Roticlear II	10 min	
96% (v/v) EtOH I	1 min	Rehydrierung

96% (v/v) EtOH II	1 min	
70% (v/v) EtOH	1 min	
50% (v/v) EtOH	1 min	
VE-Wasser	5 min	Spülen, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar sind.

Die adipogenen und osteogenen Differenzierungsansätze, die auf Chamberslides durchgeführt wurden, konnten nach Fixierung direkt gefärbt werden.

2.2.7.2 H.E.-FÄRBUNG

Die H.E.-Färbung ist eine standardisierte Färbemethode, mit welcher sich Gewebestrukturen in der Übersicht darstellen lassen. Saure Moleküle wie beispielsweise Zellkerne werden durch Hämatoxylin gefärbt und erscheinen blau. Durch Eosin, einen synthetischen, negativ geladenen Farbstoff, können alle basischen Strukturen, insbesondere Zellplasmaproteine, rot angefärbt werden.

1. Materialien

- Messzylinder
- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter
- Deckgläschen
- Pinzette

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Abzug

3. Chemikalien und Lösungen

- VE-Wasser
- Leitungswasser

- Xylol
- Ethanol (absolut, 96%, 79%, 50%)
- Hämatoxylin, sauer nach Mayer
- Eosin 1% wässrig
- Isopropanol
- Entellan®

4. Durchführung

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und verfahren wie in Tabelle 16 beschrieben.
- Anschließend fortfahren nach folgendem Protokoll (Tabelle 17).

TABELLE 17: H.E.-FÄRBEPROTOKOLL

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
Hämatoxylin (Mayer)	6 min	Färben der basophilen Strukturen
VE-Wasser	bis Wasser klar	Auswaschen des Hämatoxylins
Leitungswasser	5 min	Bläuen
Eosin	6 min	Färben der azidophilen Strukturen
VE-Wasser	mehrmals wechseln	Spülen
70% (v/v) EtOH	1min	aufsteigende Alkoholreihe, Dehydrierung
96% (v/v) EtOH	2 min	
Isopropanol I	5 min	
Isopropanol II	5 min	
Xylol I	5 min	
Xylol II	5 min	

- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen.
- Mit Entellan® und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken.

2.3.7.3 ALCIANBLAUFÄRBUNG

Die Alcianblaufärbung dient durch seine positive Ladung insbesondere zur Darstellung negativ geladener sulfatierter Proteoglykane und Glykosaminoglykane, welche von Knorpelzellen als EZM gebildet werden. Diese sind bei einem pH von 2,5 im Gegensatz zu anderen amphoteren Zellproteinen negativ geladen, wodurch eine selektive Anfärbung gelingt. Durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot können Zellkerne als rote Struktur abgegrenzt werden.

1. Materialien

- Messzylinder
- Färbeküvetten
- Trägerkorb
- Metallhenkel
- Trichter
- Faltenfilter
- Deckgläschen
- Pinzette

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Abzug

3. Lösungen

- VE-Wasser

4. Chemikalien

- Xylol
- Ethanol (96%, 79%, 50%)
- Alcianblau
- Kernechtrot
- Isopropanol
- Essigsäure 100%
- Entellan®

5. Durchführung

Herstellung der 3% Essigsäure:

- 3 ml 100% Essigsäure mit 97 ml VE-Wasser verdünnen

Ablauf der Färbung:

- Paraffinschnitte in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und verfahren wie in Tabelle 16 beschrieben.
- Anschließend fortfahren nach folgendem Protokoll (Tabelle 18).

TABELLE 18: ALCIANBLAU-FÄRBEPROTOKOLL

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
3 % (v/v) Essigsäure	3 min	
1 % (m/v) Alcianblau	30 min	Anfärben der negativ geladenen sulfatierten Proteoglykane
VE-Wasser	bis Wasser klar	Spülen
Kernechtrot	5 min	Anfärben der Zellkerne
VE-Wasser	einmal wechseln	Spülen
70% (v/v) EtOH	1 min	aufsteigende Alkoholreihe, Dehydrierung
96% (v/v) EtOH	2 min	
Isopropanol I	5 min	
Isopropanol II	5 min	
Xylol I	5 min	
Xylol II	5 min	

- Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnehmen.
- Mit Entellan® und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken.

2.3.7.4 ÖLROTFÄRBUNG

Mittels Ölrotfärbung können die von Adipozyten gebildeten Lipidtröpfchen dargestellt werden. Zur Färbung der Zellkerne kann eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt werden. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Materialien

- Deckgläser
- Pasteurpipetten
- Pipettenspitzen
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Abzug

3. Lösungen

- VE-Wasser
- Leitungswasser
- PBS⁻

4. Chemikalien

- Isopropanol
- Oilred O
- 4% Paraformaldehyd (PFA)
- 99% und 60% Isopropanol
- Hämatoxylin
- Entellan[®]

5. Durchführung

Herstellung der Lösungen:

- Stammlösung: 0,5 g Oilred O in 100 ml 99%igem Isopropanol lösen.
- Gebrauchslösung: 6 Teile der Stammlösung mit 4 Teilen VE-Wasser mischen, 24 h stehen lassen und vor Gebrauch filtrieren (Faltenfilter 150 mm).

Ablauf der Färbung:

TABELLE 19: ÖLROT-FÄRBEPROTOKOLL

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
PBS	1x spülen	
4% PFA	10 min	Fixieren
VE-Wasser	1x waschen	
60% Isopropanol	5 min	
Färbelösung	10 min	Anfärben der Lipidtröpfchen
60% Isopropanol	1x waschen	
VE-Wasser	1x waschen	
Hämatoxylin	30 sec	Anfärben der Zellkerne
Leitungswasser	1 min	Bläuen

- Objektträger in VE-Wasser überführen.
- Mit Entellan® und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken.
- Über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen. Dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

2.3.7.5 ALIZARINROT-S-FÄRBUNG

Die Alizarinrot-S-Färbung wird angewendet, um Kalzium als Zeichen der osteogenen Differenzierung nachzuweisen. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Materialien

- Deckgläser
- Pasteurpipetten
- Pipettenspitzen
- 15ml-Zentrifugenröhrchen

2. Geräte

- Abzug

3. Lösungen

- VE-Wasser
- PBS⁻
- Methanol
- Alizarinrot S
- Hämatoxylin
- Entellan[®]

4. Durchführung

Ablauf der Färbung:

TABELLE 20: ALIZARINROT-S-FÄRBEPROTOKOLL

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
PBS ⁻	1x spülen	
Methanol (eiskalt)	10 min	Fixieren
VE-Wasser	1x waschen	
Alizarinrot S	2 min	Anfärben von Kalzium
VE-Wasser	3x waschen	
Hämatoxylin	30 sec	Anfärben der Zellkerne
Leitungswasser	1 min	Bläuen

- Objektträger in VE-Wasser überführen.
- Mit Entellan[®] und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken.
- Über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

2.3.7.6 MASSON-GOLDNER-TRICHROMFÄRBUNG

Die Masson-Goldner-Trichromfärbung bietet einen differenzierten Überblick über die verschiedenen Komponenten eines Gewebes. Kollagenes Bindegewebe und mineralisierter Knochen werden leuchtend grün, Muskulatur ziegelrot, Zellkerne blau-

schwarz bis braun, Zytoplasma rot, Erythrozyten orangegelb und elastische Fasern rotviolett angefärbt. Nach Entparaffinisierung und Rehydrierung (Tabelle 16) wurde die Färbung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

TABELLE 21: MASSON-GOLDNER-TRICHROM-FÄRBEPROTOKOLL

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
Eisenhämatoxylin nach Weigert (Gebrauchslösung)	5 min	Färben der Kerne
Leitungswasser	10 min	Bläuen
Säurefuchsin-Ponceau (Goldner I)	6 min	Färben des Zellplasmas
Leitungswasser	2x 30 sec	Spülen
Phosphormolybdänsäure-Orange G	2 min	Beizen und Färben
Leitungswasser	2x 30 sec	Spülen
Lichtgrün (Goldner III)	8 min	Färben der Fasern
Leitungswasser	10 sec	Spülen
96% (v/v) EtOH	2 min	aufsteigende Alkoholreihe,
96% (v/v) EtOH	5 min	Dehydrierung
Isopropanol	5 min	
Xylol I	10 min	
Xylol II	10 min	

- Objektträger in VE-Wasser überführen.
- Mit Entellan® und einem Deckglas luftblasenfrei eindecken.
- Über Nacht unter dem Abzug trocknen lassen, dabei darauf achten, dass die Objektträger waagrecht positioniert werden, um ein Verrutschen der Deckgläser zu verhindern.

2.3.8 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG

Die immunhistochemische Färbung dient dem Nachweis von bestimmten Gewebeeigenschaften durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Es lassen

sich hierbei zellspezifische Proteine wie beispielsweise Kollagen II nachweisen. Die verwendeten Antikörper und ihre Isotypen sowie deren Eigenschaften wurden in Tabelle 6 und Tabelle 7 beschrieben. Die immunhistochemische Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel und Trägerkorb
- Pasteurpipetten
- Deckgläser
- Reaktionsgefäße
- Feuchtekammer
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Mikropipetten

3. Lösungen

- Primärantikörper
- Isotyp-Kontrolle
- PBS-Waschpuffer mit 0,5% Tween-20
- Antigendemaskierungs-Puffer: entsprechend des Primärantikörpers
- 3% H₂O₂ (immer frisch ansetzen und dunkel aufbewahren)
- Antikörper-Verdünnungslösung (DCS Innovative Diagnostik-Systeme #ALI20R500)
- Hämalun
- ab- bzw. aufsteigende Alkoholreihe, Roticlear (entspricht Xylol)
- Entellan®
- Blocklösung: 3% BSA in PBS⁻
- Detektionssystem:
DCS Super Vision 2 HRP-Polymer-Kit (DCS Innovative Diagnostik-Systeme PD000KIT):
 - DCS Polymer-Enhancer (Link): sekundäre Anti-Maus IgG und Anti-Kaninchen IgG

- DCS HRP-Polymer-Reagenz (Label): mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer gegen Maus- und Kaninchen-AK
- Substrat-Chromogen: DAB-Konzentrat (3,3'-Diaminobenzidin) und DAB-Substratpuffer (AEC⁺ Substratchromogen (3-Amino-9-Ethylkarbazol))

4. Durchführung

Paraffinschnitte müssen entparaffinisiert und eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden. Bei Fixierung mit PFA (auch Kryoschnitte) erfolgt in der Regel eine Antigendemaskierung.

Vorbereitung der Schnitte:

- Paraffinschnitte im Beschriftungsfeld mit Kürzel für zu färbenden Antikörper (AK) versehen.
- Isotypkontrolle nicht vergessen und ggf. Nativ-Gewebeschnitt als Positivkontrolle.
- Schlecht haftende Schnitte ü.N. bei 37°C im Wärmeschrank lagern.
- Schnitt in einen Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank (60°C) stellen (Paraffin sollte geschmolzen sein).
- Weiter wie in Tabelle 16 beschrieben.

Demaskierung der Epitope A (hitzeinduzierte Epitopdemaskierung):

- Demaskierung der Schnitte in entsprechendem 1x Puffer (90-100°C vorgewärmt im Dampfgarer/Schnellkochtopf, 20 min/10 min).
- In VE-Wasser überführen und mit Fettstift umranden, danach in Waschpuffer geben.

Demaskierung der Epitope B (enzymatisch):

- Schnitte mit Fettstift bzw. Diamantstift umranden.
- Enzym auftauen und 50-100 µl auf den Schnitt pipettieren. 12 min
- Waschen mit Waschpuffer. 5 min

IHC-Vorbereitung

- Herstellung der AK-Verdünnung mit Antikörper-Verdünnungslösung.
- Negativkontrolle: mit IgX, Proteinkonzentration auf gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers einstellen.

- Ist die AK-Konzentration unbekannt, erfolgt die Negativkontrolle nur mit AK-Verdünnungslösung.

Blockieren der zelleigenen Peroxidase (optional, wichtig für Zellen, die endogene Peroxidasen besitzen, z.B. Zellen aus dem Blut/Knochenmark):

- Schnitte mit 3% H₂O₂ in VE-Wasser (50-100 µl pro Schnitt/Kammer/Spot) behandeln. 10 min
- Waschen mit Waschpuffer. 5 min
- Bei Bedarf Schnitte mit Blocklösung zur Hintergrundreduzierung behandeln. 30 min

Überschichten mit 50-100 µl Primärantikörper bzw. IgG-Kontrolle in entsprechender Verdünnung:

- Inkubation abhängig vom Primärantikörper, Richtwerte: 60 min bei RT oder ü. N. bei 4°C.
- AK-Lösung bzw. IgX-Kontrolle abtropfen lassen.
- 3x Waschen mit Waschpuffer. je 5 min

Ab hier im Dunkeln weiterarbeiten:

- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen Polymer-Enhancer.
- Inkubation bei RT. 10 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer. je 5 min
- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen HRP-Polymer.
- Inkubation bei RT 20 min.
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min.
- Überschichten der Zellen mit DAB Lösung (Lösung ist 1 Woche bei 4°C haltbar), Inkubation je nach Antikörper (Sichtkontrolle: zwischen 30 sec bis 10 min, i.d.R. 5 min).
- Schnitte in Waschpuffer überführen.
- Gegenfärbung mit Hämalaun. 3 min
- Bläuen in Leitungswasser. 10 min
- Überführen in VE Wasser.

TABELLE 22: AUFSTEIGENDE ALKOHOLREIHE, DEHYDRIERUNG

Lösung	Zeit	Prozess + Bemerkung
70% (v/v) EtOH	1 min	aufsteigende Alkoholreihe,
96% (v/v) EtOH	2 min	Dehydrierung
Isopropanol I	2 min	
Isopropanol II	2 min	
Xylol I	3 min	
Xylol II	3 min	

- Eindecken mit organischem Eindeckmittel.
- Schnitte ü. N. unter dem Abzug trocknen lassen.

2.3.9 BIOMECHANISCHE MESSUNG

Um die Reißfestigkeit der Bandkonstrukte nach 21 Tagen Kultur beurteilen zu können, wurde eine biomechanische Messung als Maximallastversuch bis zum Zerreißen der Konstrukte an einer Materialtestmaschine, der Zwick Z020 (Abbildung 6, Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Leitung experimentelle Forschung: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk), durchgeführt. Wichtig war hierbei, die Konstrukte stets feucht zu halten, um eine Veränderung der Materialeigenschaften durch Austrocknung zu vermeiden. Alle Konstrukte hatten eine vordefinierte Länge von 3,0 cm und einen Durchmesser von 2,5 bis 3,0 mm. Für alle Messungen wurde eine Vorspannung von 1 N angelegt, die Messgeschwindigkeit betrug 30 mm/min.

Da die Konstrukte nicht alle den gleichen Durchmesser aufwiesen, konnte zur Vergleichbarkeit nur die Spannung δ , nicht aber die Maximalkraft F_{\max} herangezogen werden. Die Spannung δ ist ein Maß für die Kraft pro Fläche, die Einheit lautet also N/mm^2 oder MPa, wobei

$$A = \pi * d^2 / 4 \text{ und}$$

$$\delta = F_{\max} / A$$

gilt.



ABBILDUNG 6: VERSUCHSAUFBAU DER BIOMECHANISCHEN MESSUNG AN DER ZWICK

2.3.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgten mit Hilfe der Programmiersprache Python in der web-basierten interaktiven Umgebung Jupyter-Notebook.

Um die Bedingungen für parametrische Tests zu beurteilen, wurde einerseits der Shapiro-Test (Verteilung) und andererseits der Levene-Test (Varianz) mit einem Signifikanzniveau von 5 % angewandt.

Bei Versuchen mit kleiner Gruppengröße ($n \leq 12$) wurden direkt nicht-parametrische Tests verwendet.

Bei normalverteilten Datensätzen mit ähnlicher Varianz wurde bei Vorliegen von mehr als zwei Gruppen zunächst eine One-Way ANOVA angewandt. Die weiterführende Untersuchung statistischer Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit

Hilfe eines post hoc pairwise t-Tests. In Fällen multipler Testung wurden die p-Werte nach der Holm-Bonferroni Methode korrigiert, um die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art zu reduzieren.

Nicht normalverteilte Gruppen wurden auf ihre Unterschiede hin mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Bei Vorliegen von mehr als zwei Gruppen wurde zunächst ein Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um mögliche Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen zu zeigen, wurde ein post hoc Dunn's Test verwendet. In Fällen multipler Testung wurde eine p-Wert Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode vorgenommen.

Um die Unabhängigkeit kategorischer Daten zu untersuchen, wurde der Chi-Quadrat-Test genutzt. Bei Nicht-Erfüllung der Voraussetzungen wurde ein Exakter Test nach Fisher durchgeführt.

Die Berechnung der 95% Konfidenzintervalle erfolgte nach der Formel:

$$\hat{p} \pm t^* \times \sqrt{p(1-p)/n}$$

Das Signifikanzniveau α wurde mit 5 % angesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 EINTEILUNG DER BIOPSIEN SOWIE ANALYSE DER PATIENTENDATEN

Vor Durchführung der verschiedenen im Kapitel 2.2 beschriebenen Versuche, erfolgte eine Einteilung der Biopsien in drei Gruppen anhand der Latenz zwischen VKB-Ruptur und Biopsieentnahme im Rahmen der VKB-Plastik. Bei Gruppe I waren dies 1-30 Tage, bei Gruppe II 31-90 Tage, bei Gruppe III > 90 Tage als Äquivalente für akute, subakute und verzögerte Rupturversorgung.

Es war nicht möglich, alle Versuche an allen Proben durchzuführen, da die Biopsien zum Teil sehr klein waren und somit nur wenige Zellen isoliert werden konnten. Tabelle 23, Tabelle 24 und Tabelle 25 bieten eine Übersicht, welche Probe für welchen Versuch verwendet worden ist. Solange nicht anders erwähnt, wurden alle Versuche in jeder der drei Gruppen an je mindestens n=3 Proben durchgeführt. Da die Zellausbeute aus je einer Biopsie sehr unterschiedlich war, konnten die Zellen eines Spenders unterschiedlich vielen Experimenten zugeführt werden. Dementsprechend unterscheidet sich auch die Anzahl der Proben, mit welchen ein bestimmtes Experiment durchgeführt worden ist.

TABELLE 23: GRUPPE I, ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDUNG DER PROBEN

Proben- name (Biopsie)	Name gruppiert	Patientendaten (Alter, Geschlecht)	Latenz Ruptur/ Proben- entnahme	Versuche
VKB 5.2	VKB I.1	29 J., m	11 Tage	FACS, Diff.
VKB 19	VKB I.2	30 J., w	6 Tage	WK, Diff.
VKB 22	VKB I.3	20 J., m	30 Tage	WK, Diff.
VKB 33	VKB I.4	53 J., w	24 Tage	WK, FACS, Diff.
VKB 47	VKB I.6	23 J., m	30 Tage	FACS
VKB 58	VKB I.7	23 J., m	22 Tage	FACS

TABELLE 24: GRUPPE II, ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDUNG DER PROBEN

Proben- name (Biopsie)	Name gruppiert	Patientendaten (Alter, Geschlecht)	Latenz Ruptur/ Probenentnahme	Versuche
VKB 7.2	VKB II.1	28, m	2 Monate	BK, Diff.
VKB 8.2	VKB II.2	26, m	2 Monate	BK, Diff.
VKB 9.2	VKB II.3	43, w	2,5 Monate	BK, Diff.
VKB 11.2	VKB II.4	18, m	2 Monate	Diff.
VKB 29	VKB II.5	25, m	2,5 Monate	WK, FACS, Diff.
VKB 30	VKB II.6	50, w	2 Monate	WK, FACS
VKB 31	VKB II.7	21, m	2,5 Monate	Diff.
VKB 34	VKB II.8	23, m	31 Tage	WK, FACS
VKB 36	VKB II.9	25, w	5 Wochen	WK
VKB 37	VKB II.10	19, m	7 Wochen	WK
VKB 44	VKB II.11	50, w	8 Wochen	FACS

TABELLE 25: GRUPPE III, ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDUNG DER PROBEN

Proben- name (Biopsie)	Name gruppiert	Patientendaten (Alter, Geschlecht)	Latenz Ruptur/ Probenentnahme	Versuche
VKB 6	VKB III.1	27, m	5 Monate	Diff.
VKB 17	VKB III.2	26, w	7 Monate	WK
VKB 18	VKB III.3	22, m	3,5 Monate	WK, FACS
VKB 20	VKB III.4	19, m	5 Monate	WK, Diff.
VKB 21	VKB III.5	37, w	11 Monate	WK
VKB 23	VKB III.6	19, m	3 Monate + 2 Tage	WK, Diff.
VKB 24	VKB III.7	27, w	3,5 Monate	WK, FACS, Diff.

VKB 32	VKB III.8	14, w	13 Monate	WK
VKB 55	VKB III.9	10, m	3,5 Monate	FACS

Nach Einteilung der Biopsien in die jeweilige Gruppe wurde das durchschnittliche Alter der Patienten sowie die Geschlechtsverteilung bestimmt. Die Patienten in Gruppe I waren im Schnitt 29,67 ($\pm 12,06$) Jahre alt, vier waren männlich, zwei weiblich. In Gruppe II betrug das Durchschnittsalter 29,82 ($\pm 11,97$) Jahre, sieben der Patienten waren männlich, vier weiblich. In Gruppe III waren die Patienten durchschnittlich 23,38 ($\pm 7,91$) Jahre alt, fünf von ihnen waren männlich, drei weiblich. Weder bezüglich der Altersverteilung (Kruskal-Wallis Test, $p = 0,519$, siehe Abbildung 7) noch bezüglich der Geschlechtsverteilung (Exakter Test nach Fisher, $p = 1,0$, siehe Abbildung 8) unterschieden sich die drei Gruppen signifikant.

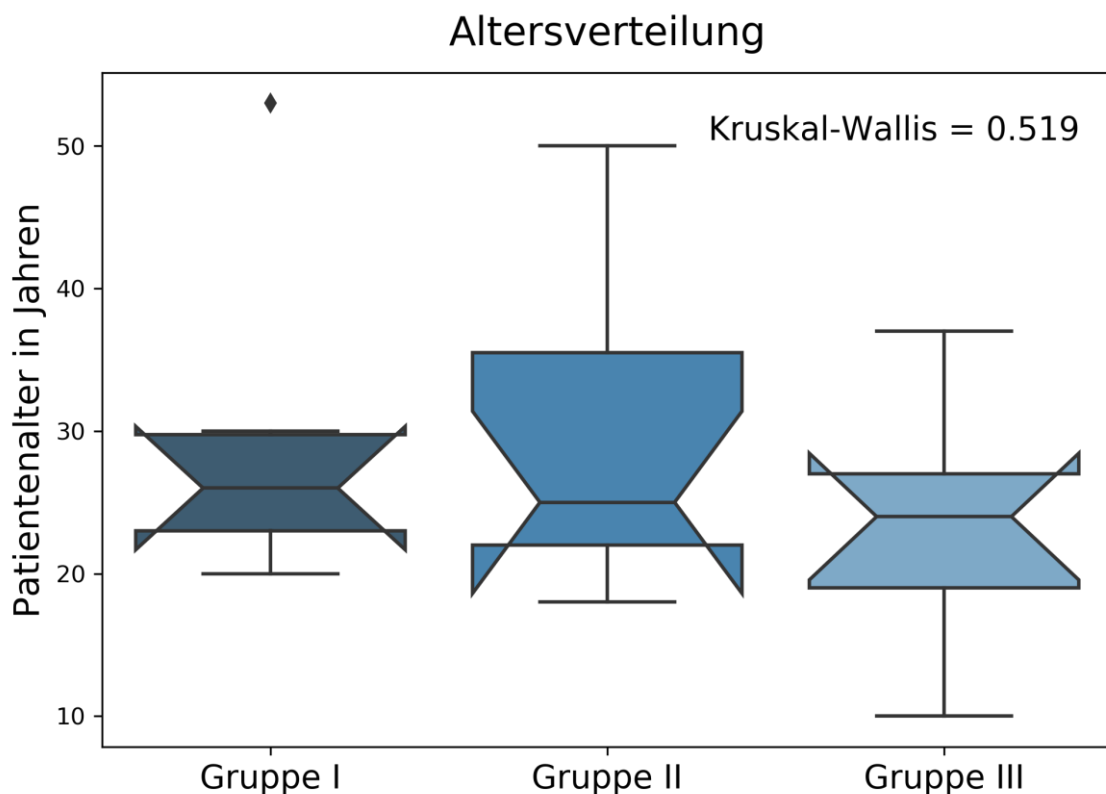


ABBILDUNG 7: ALTER DER PATIENTEN IN DEN VERSCHIEDENEN PROBENGRUPPEN

Gruppe I 29,67 ($\pm 12,06$) Jahre, Gruppe II 29,82 ($\pm 11,97$) Jahre, Gruppe III (23,38 ($\pm 7,91$) Jahre; es bestanden keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Altersverteilung in den drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,591$).

Geschlechtsverteilung

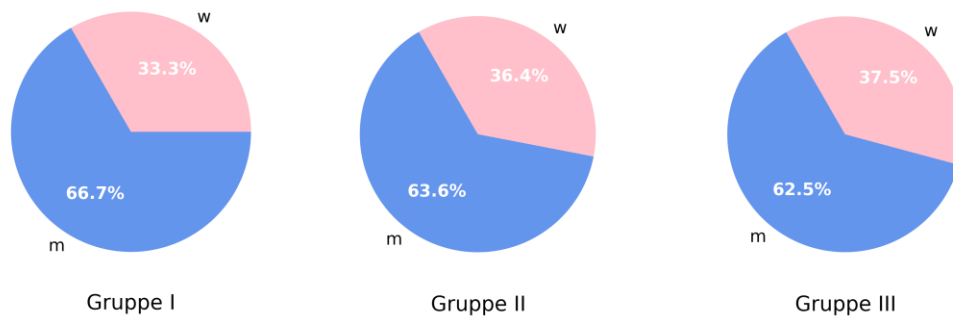


ABBILDUNG 8: GESCHLECHTSVERTEILUNG DER PATIENTEN IN DEN DREI PROBENGRUPPEN

Gruppe I m = 4, w = 2, Gruppe II m = 7, w = 4, Gruppe III m = 5, w = 3; es bestanden keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Geschlechtsverteilung in den drei Gruppen (Exakter Test nach Fisher, $p = 1,0$).

3.2 QUANTITATIVE CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN ZELLEN

Zellen sowie deren Proliferations- und Synthesepotential sind entscheidende Faktoren für die Entstehung oder Regeneration eines Gewebes, egal ob im Rahmen eines physiologischen Heilungsprozesses, nach einer Operation oder im Tissue Engineering. Um die in den Biopsien enthaltenen Zellen und deren Eigenschaften beurteilen zu können, wurden diese aus VKB-Biopsien isoliert wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Nach erfolgreicher Isolation konnten die ersten Daten über die Biopsien und die daraus isolierten Zellen ermittelt werden. Es wurde die Zellzahl bestimmt und in Relation zur Masse der Biopsie gesetzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben unterschiedlicher Größe und Masse zu ermöglichen. Zur Ermittlung des Wachstumspotentials der Zellen, erfolgte die Kultivierung in 24well-Platten und die Erstellung einer Wachstumskurve. Darüber hinaus wurde die Zellviabilität zum Zeitpunkt der Isolation und im Verlauf ermittelt wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

3.2.1 ZELLZAHL

Die Ausgangszellzahl unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei Versuchsgruppen (Kruskal-Wallis, $p = 0,503$). In Gruppe I konnten durchschnittlich 4.432,24 ($\pm 4.193,86$) Zellen pro mg Gewebe, in Gruppe II 4.328,04 ($\pm 3.819,12$) Zellen

pro mg Gewebe und in Gruppe III 2.925,55 ($\pm 3.857,36$) Zellen pro mg Gewebe isoliert werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 9 als Boxplots zusammengefasst.

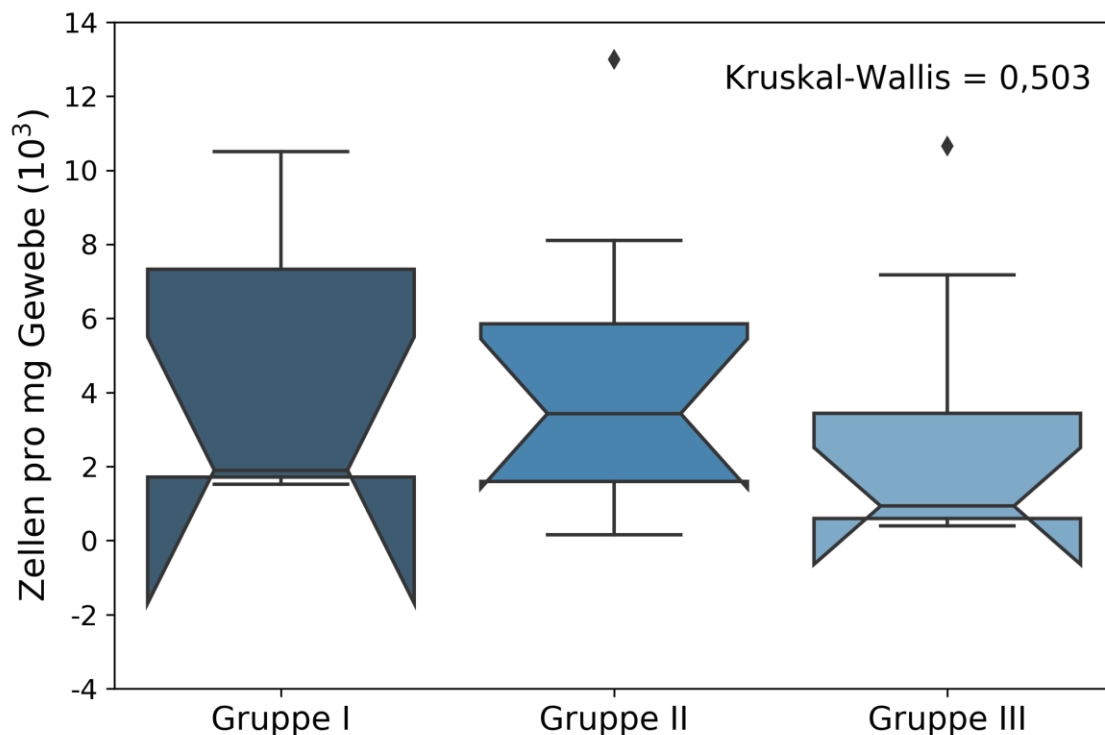


ABBILDUNG 9: ANZAHL DER ISOLIERTEN ZELLEN PRO MG GEWEBE

Gruppe I 4.432,24 ($\pm 4.193,86$) Zellen/mg Gewebe; Gruppe II 4328,04 ($\pm 3.819,12$) Zellen/mg Gewebe; Gruppe III 2.925,55 ($\pm 3.857,36$) Zellen/mg Gewebe; es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis, $p = 0,503$).

3.2.2 ZELLWACHSTUM

Das Wachstumspotential sollte mittels Wachstumskurven quantifiziert werden. Hierzu wurden die Zellen der verwendeten Proben direkt nach Isolation in 24well-Platten je nach Anzahl der isolierten Zellen in Duplikaten oder Triplikaten ausgesät und in MSCGM kultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). Zu jeweils vier Zeitpunkten erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl. Diese Mittelwerte mehrerer Proben jeweils einer Gruppe ($n \geq 3$) sind im Zeitverlauf in Abbildung 10 dargestellt. Sobald eine Probe einen Peak erreichte und ein später gezählter Wert kleiner war, wurde dies als Zeichen einer Überwucherung bzw. eines beginnenden Zelltods bei Nährstoffmangel aufgrund zu

vieler Zellen gewertet und der Wert nicht mehr berücksichtigt, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Auffallend war auch bei diesem Versuch, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sehr groß waren.

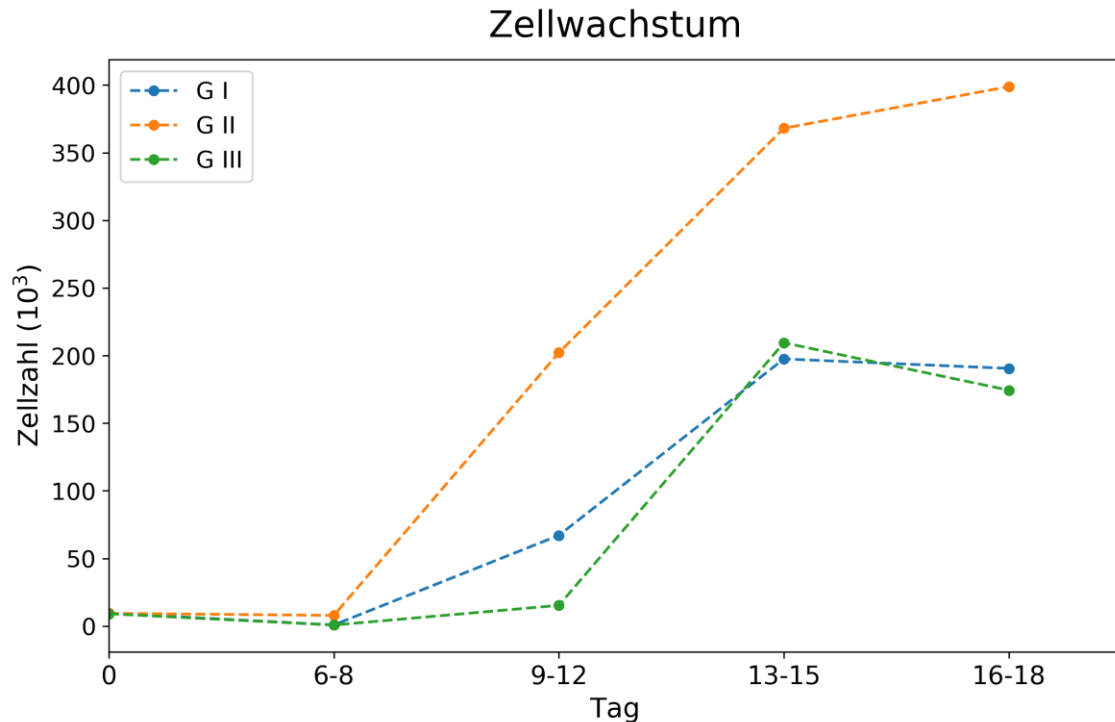


ABBILDUNG 10: WACHSTUMSKURVEN

Gruppe I, II und III zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Betrachtet man die Kurven, imponiert das Wachstum der Zellen aus Gruppe II als am schnellsten. Es ergibt sich ein starker Trend dafür, dass ein Unterschied zwischen den 3 Gruppen zu Zeitpunkt 1 (nach 6-8 d: Kruskal-Wallis, $p = 0,086$) und zu Zeitpunkt 2 (nach 9-12 d: Kruskal-Wallis, $p = 0,065$) besteht. Außerdem kann ein Trend dafür festgestellt werden, dass ein Unterschied zwischen Gruppe II und Gruppe I (Zeitpunkt 1: $p = 0,181$; Zeitpunkt 2: $p = 0,127$) sowie zwischen Gruppe II und Gruppe III (Zeitpunkt 1: $p = 0,181$; Zeitpunkt 2: $p = 0,106$) besteht, jedoch kein Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe III (Zeitpunkt 1: $p = 0,796$; Zeitpunkt 2: $p = 0,910$). Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass ein starker Trend dafür besteht, dass die Zellen aus Gruppe II das größte Wachstumspotential aufweisen.

Die Wachstumskurve von Gruppe II imponiert bei Betrachtung deutlich steiler als die der anderen beiden Gruppen. In der statistischen Auswertung kann ein starker Trend für einen Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den drei Versuchsgruppen zu den ersten zwei Messzeitpunkten (6-8 d sowie 9-12 d nach Isolation/ Aussaat, Testung

nach Kruskal-Wallis, Zeitpunkt 1 = 0,086, Zeitpunkt 2 = 0,065) festgestellt werden. Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde die Auswertung um einen Post-hoc Dunn's Test mit einer p-Wert Korrektur nach Holm-Bonferroni erweitert. Hier konnte der Trend festgestellt werden, dass ein Unterschied zwischen Gruppe II und Gruppe I (Zeitpunkt 1: $p = 0,181$; Zeitpunkt 2: $p = 0,127$) sowie zwischen Gruppe II und Gruppe III (Zeitpunkt 1: $p = 0,181$; Zeitpunkt 2: $p = 0,106$) besteht, jedoch kein Unterschied zwischen Gruppe I und Gruppe III (Zeitpunkt 1: $p = 0,796$; Zeitpunkt 2: $p = 0,910$). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein starker Trend besteht, dass die Zellen aus Gruppe II das größte Wachstumspotential aufweisen.

Zusätzlich konnte durch diesen Versuch nachgewiesen werden, dass die isolierten Zellen die Fähigkeit besitzen, sich an Oberflächen aus Plastik anzuheften. Diese Eigenschaft ist eine der Voraussetzungen, um eine Zelle als MSC identifizieren zu können [92]. Diese Eigenschaft kann in Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 13, welche exemplarisch mikroskopische Bilder aus allen drei Probengruppen zu den vier Zeitpunkten der Wachstumskurve zeigen, nachvollzogen werden. Außerdem lassen sich hier die Beobachtungen aus der quantitativen und statistischen Auswertung visualisieren. Insbesondere zu Zeitpunkt 1 zeigt sich in Gruppe II die höchste Zahl adhärenter Zellen. Zu Zeitpunkt 2 erreicht diese Probe bereits eine fast vollständige Konfluenz im Gegensatz zu einer ca. 75%igen Konfluenz in Gruppe I und ca. 40%igen Konfluenz in Gruppe III. In Gruppe III kugeln sich die Zellen zum Zeitpunkt 4 bereits ab (Abbildung 13 D), wohingegen die Proben aus Gruppe II bei deutlich höherer Zellzahl noch adhären sind (Abbildung 12 D), was für eine stabilere Zellkultur spricht.

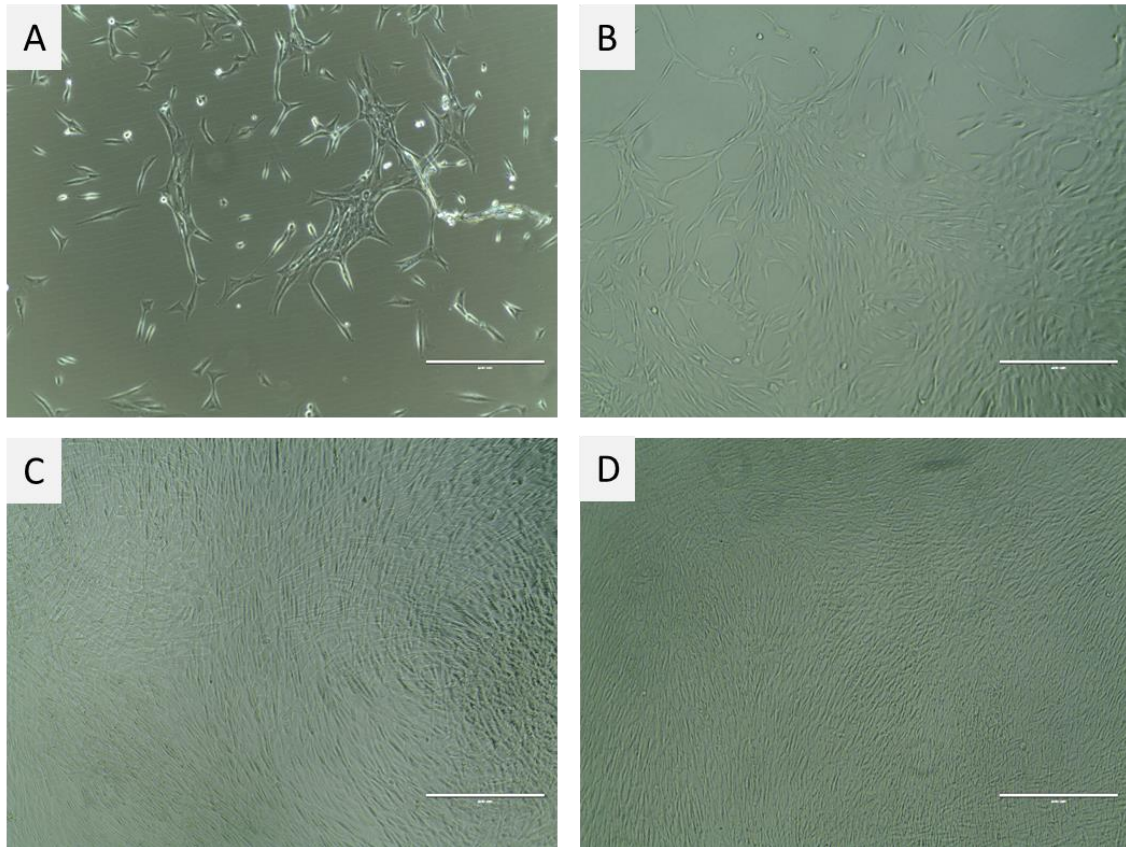


ABBILDUNG 11: KULTIVIERUNG DER ZELLEN VON VKB I.4 IM ZEITLICHEN VERLAUF

A Zeitpunkt 1 (d6); **B** Zeitpunkt 2 (d10), **C** Zeitpunkt 3 (d13), **D** Zeitpunkt 4 (d16);
Maßstab Balken jeweils 400 µm.

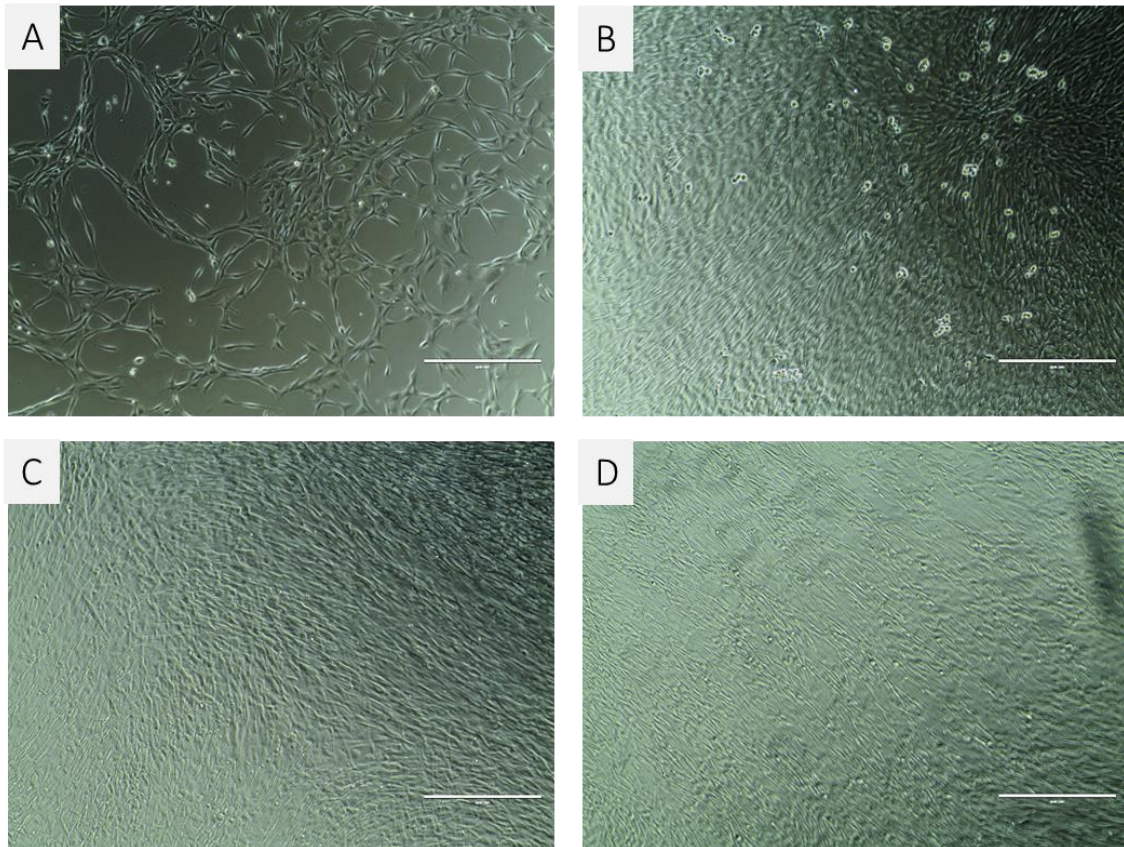


ABBILDUNG 12: KULTIVIERUNG DER ZELLEN VON VKB II.10 IM ZEITLICHEN VERLAUF

A Zeitpunkt 1 (d7); **B** Zeitpunkt 2 (d10), **C** Zeitpunkt 3 (d13), **D** Zeitpunkt 4 (d17);
Maßstab Balken jeweils 400 µm.

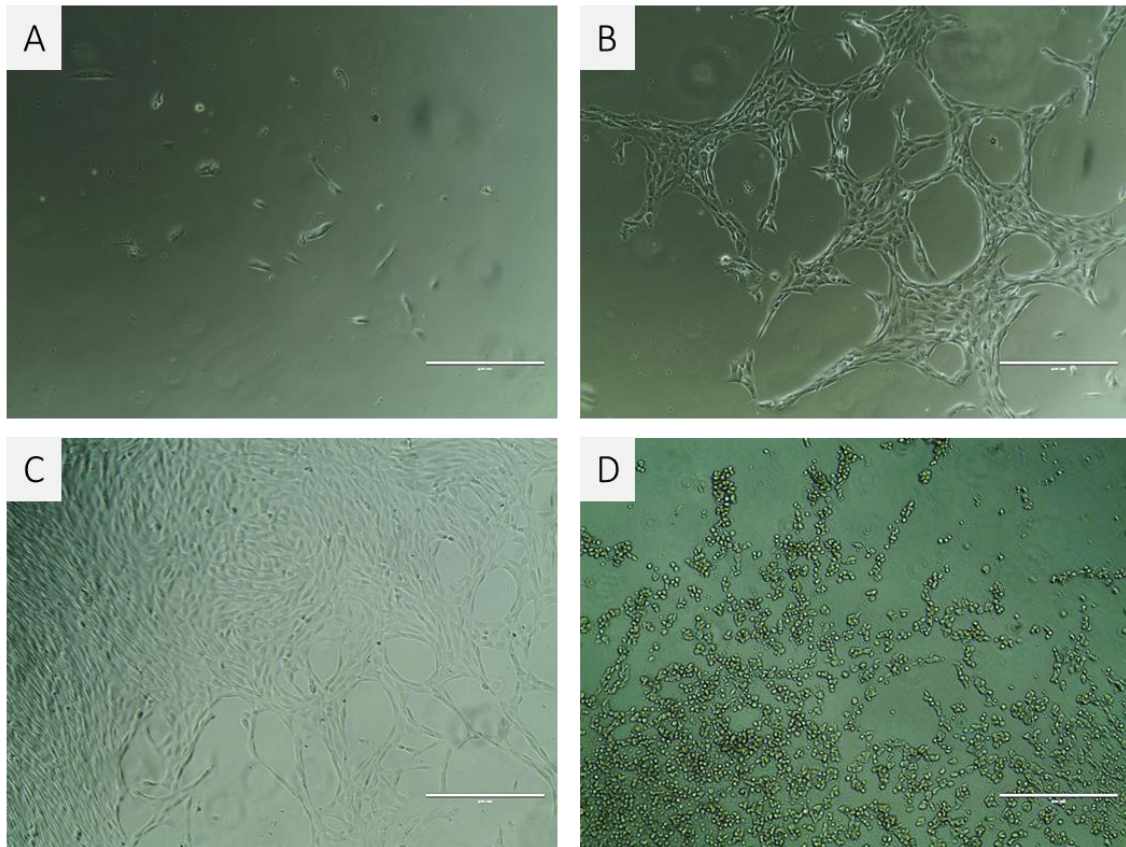


ABBILDUNG 13: KULTIVIERUNG DER ZELLEN VON VKB III.8 IM ZEITLICHEN VERLAUF

A Zeitpunkt 1 (d7); **B** Zeitpunkt 2 (d10), **C** Zeitpunkt 3 (d13), **D** Zeitpunkt 4 (d16); Maßstabbalken jeweils 400 μm .

3.2.3 ZELLVIABILITÄT

Entscheidender als die absolute Zellzahl der aus der Biopsie isolierten Zellen für das Proliferations- und Synthesepotential ist der Anteil der lebenden Zellen. Zur Ermittlung der Zellviabilität direkt nach Isolation der Zellen aus dem Gewebe wurden die Zellen gezählt (vgl. Abschnitt 2.2.2.2). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (vgl. Abbildung 14). Dementsprechend kann von einer vergleichbaren Ausgangssituation in den drei Gruppen für die weiteren Versuche ausgegangen werden.

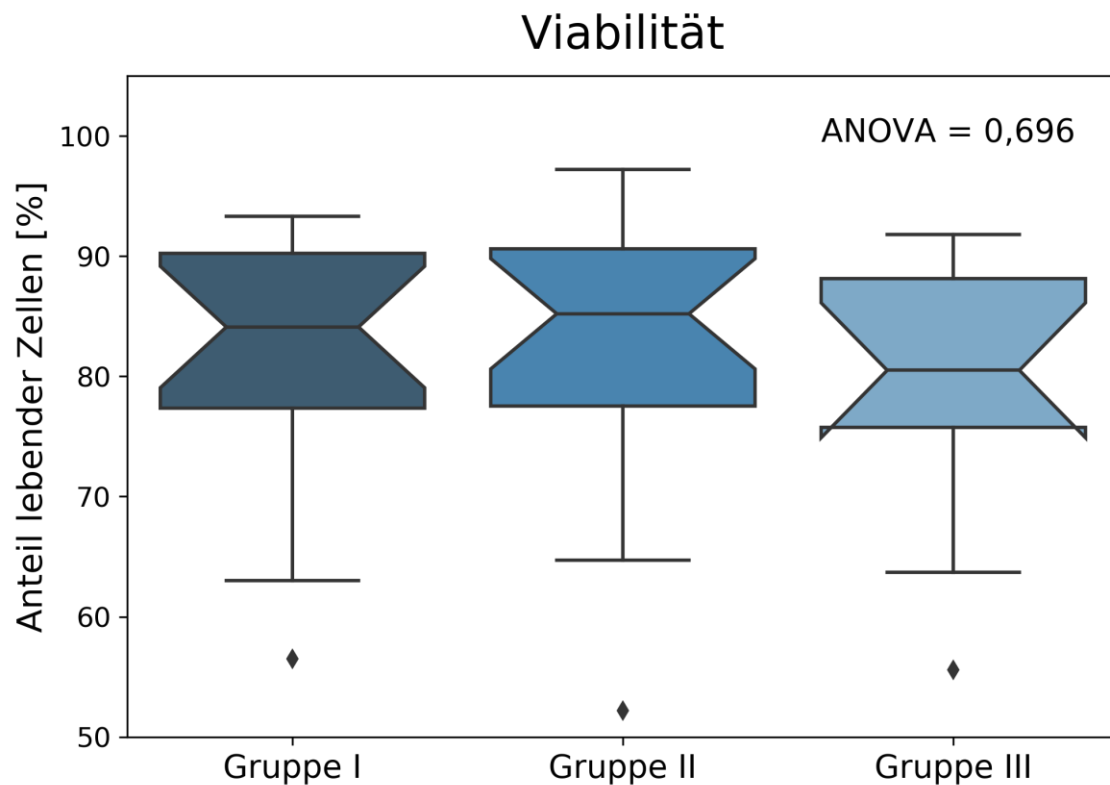


ABBILDUNG 14: ZELLVIABILITÄT NACH ISOLIERUNG (PASSAGE 00)

Gruppe I 83,2% ($\pm 10,7$), Gruppe II 83,57% ($\pm 11,6$), Gruppe III 79,62% ($\pm 11,8$). Zwischen den drei Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied bzgl. des Anteils an lebenden Zellen direkt nach Isolierung (ANOVA, $p = 0,696$).

3.3 NACHWEIS VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN IN DEN BIOPSIEN AUS VORDEREN KREUZBÄNDERN

Der Nachweis dreier kombinierter Eigenschaften – Plastikadhärenz, Differenzierungspotential in die osteogene, adipogene und chondrogenex Zellreihe sowie ein spezifisches Oberflächenantigenmuster – erlaubt die Definition einer Zelle als MSC [92]. Die Plastikadhärenz konnte bereits bei Kultivierung der Zellen für die Erstellung der Wachstumskurven nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Die folgenden beiden Kapitel beschäftigen sich mit den anderen beiden Eigenschaften.

3.3.1 DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL

Um nachzuweisen, dass eine Zellpopulation in der Lage ist, in eine spezifische Zellreihe auszudifferenzieren, müssen entsprechende Kulturbedingungen geschaffen werden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. So kann bei MSCs u.a. das adipogene, chondrogene sowie osteogene Differenzierungspotential der Zellen angeregt werden, was wiederum als Voraussetzung gilt, um eine Zelle als MSC bezeichnen zu können [92].

Die Kultivierung der Zellen in adipogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage führte zur Ausbildung kleiner Lipidtröpfchen, welche durch eine Ölrotfärbung (vgl. 2.2.7.4) visualisiert werden konnten (Abbildung 15). Durch die Kultivierung der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium für 28 Tage war der Nachweis von charakteristischem Kalzium durch Alizarinrot-S-Färbung (vgl. 2.2.7.5) möglich (Abbildung 16). Die entsprechenden Negativkontrollen, welche über denselben Zeitraum in Stammzellmedium kultiviert worden waren, ergaben keine Ausbildung der charakteristischen Merkmale. In Gruppe I und III konnte keine Negativkontrolle der Alizarinrot-S-Färbung angefertigt werden, da es durch den sehr langen Zeitraum der Kultivierung von 4 Wochen in allen durchgeführten Versuchsansätzen dieser beiden Gruppen zu einer „Abkuglung“ der Zellen kam, diese verloren also ihre Adhärenz zum Kulturgefäß. Zur besseren Übersicht wurde neben der Ölrotfärbung bzw. Alizarinrot-S-Färbung eine Färbung mit Hämatoxylin zur Blaufärbung der Zellkerne durchgeführt. Diese liegen in den Negativkontrollen deutlich dichter aneinander, was auf eine höhere Zellzahl mit weniger dazwischenliegender EZM hinweist. Nach Kultivierung der Zellen in mit TGF- β 3 supplementiertem chondrogenem Differenzierungsmedium für 21 Tage gelang der Nachweis negativ geladener sulfatierter Proteoglykane und Glykosaminoglykane, die chondrogenen Pellets konnten kräftig mit Alcianblau gefärbt werden. Die Färbung der Negativkontrollen ist hingegen deutlich schwächer ausgeprägt (Abbildung 17). Außerdem konnte in einer immunhistochemischen Färbung Kollagen II in den chondrogen stimulierten Pellets durch eine Braunfärbung durch DAB nachgewiesen werden, was bei den jeweiligen Negativkontrollen nicht möglich war. Hier wurde also kein Kollagen II gebildet (Abbildung 18 B-C). Im Rahmen der

immunhistochemischen Färbung wurden zum Vergleich eine Positivkontrolle (Abbildung 18 A) sowie jeweils eine Isotypenkontrolle (Abbildung 18 B-C, obere rechte Ecke) angefertigt.

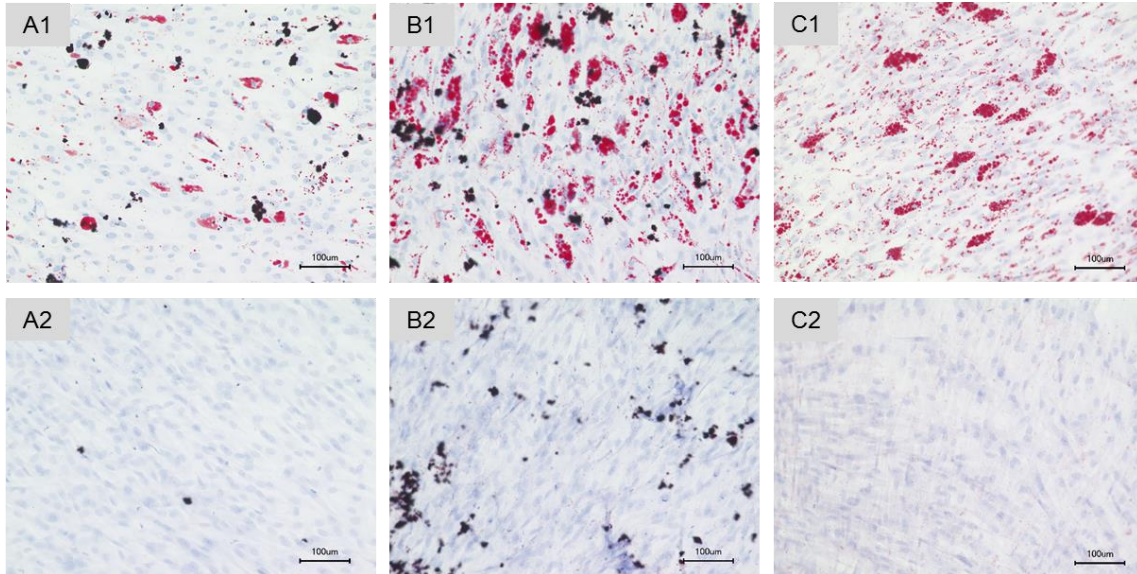


ABBILDUNG 15: NACHWEIS DES ADIPOGENEN DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS MITTELS ÖLROTFÄRBUNG

A1, B1 und **C1** zeigen jeweils den adipogenen Differenzierungsansatz aus Gruppe I, II und III nach 14 Tagen Kultivierung, **A2, B2** und **C2** zeigen die dazugehörigen Negativkontrollen, welche über denselben Zeitraum mit Stammzellmedium kultiviert wurden; in allen drei Gruppen konnten mittels Ölrotfärbung kleine Lipidtröpfchen angefärbt werden, eine adipogene Differenzierung hat stattgefunden; alle Maßstabsbalken 100 µm.

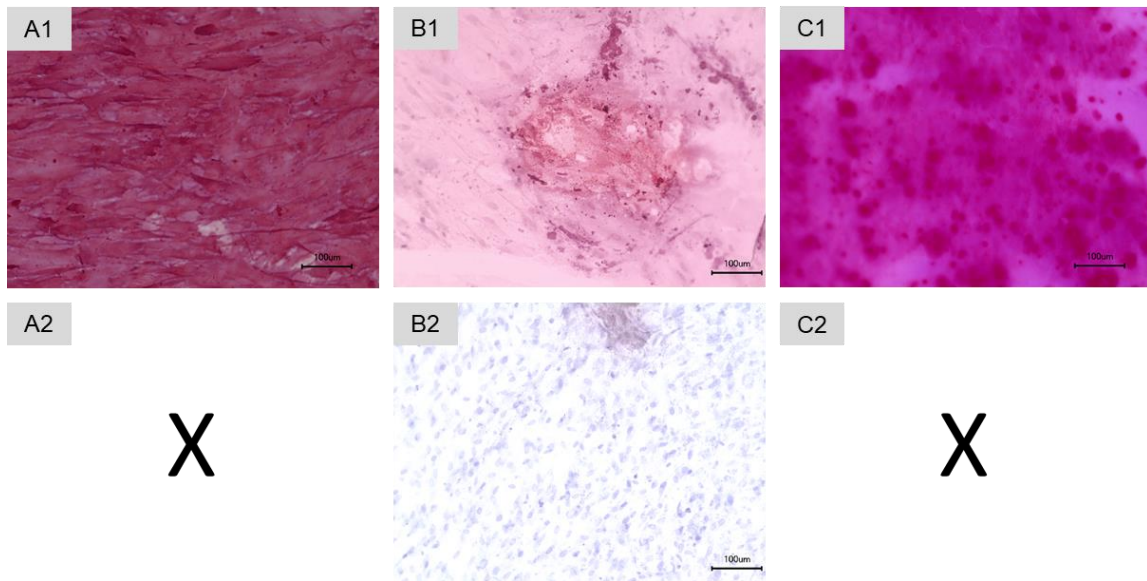


ABBILDUNG 16: NACHWEIS DES OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS MITTELS ALIZARINROT-S-FÄRBUNG

A1, **B1** und **C1** zeigen jeweils den osteogenen Differenzierungsansatz aus Gruppe I, II und III nach 28 Tagen Kultivierung, in allen drei Gruppen konnte Kalzium als Merkmal für die osteogene Differenzierung nachgewiesen werden; **B2** zeigt exemplarisch für alle drei Gruppen eine Negativkontrolle aus Gruppe II, welche über denselben Zeitraum mit Stammzellmedium kultiviert wurde; die Negativkontrollen aus Gruppe I und III haben sich vor Beendigung der 28tägigen Kultivierung abgelöst, dementsprechend war es nicht möglich eine Kontrollfärbung anzufertigen; alle Maßstabsbalken 100 µm.

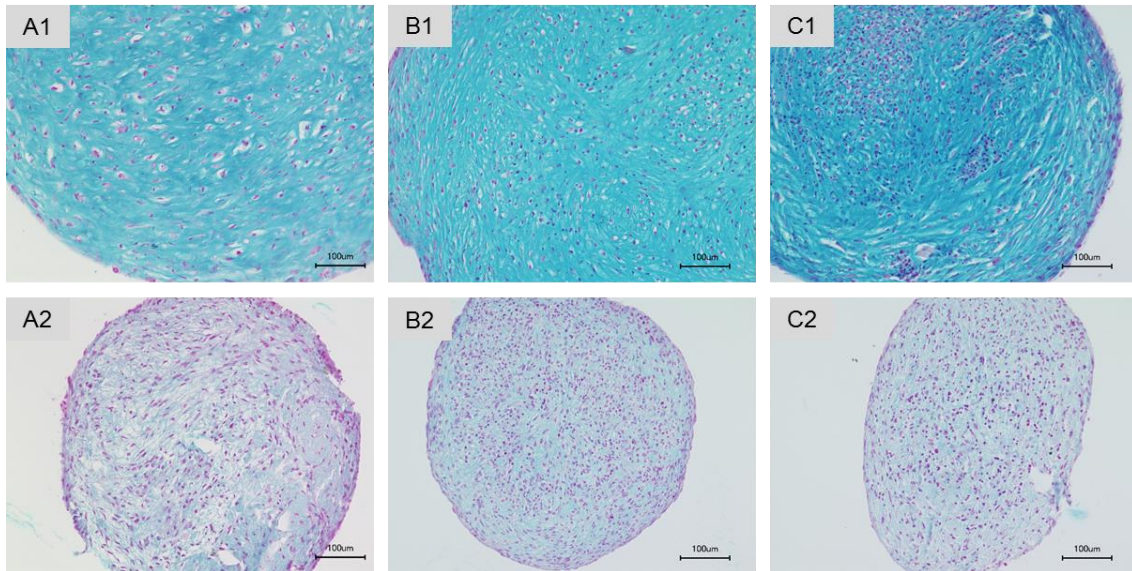


ABBILDUNG 17: NACHWEIS DES CHONDROGENEN DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS DURCH ALCIANBLAUFÄRBUNG

A1, **B1** und **C1** zeigen jeweils den chondrogenen Differenzierungsansatz aus Gruppe I, II und III nach 21 Tagen Kultivierung der Pellets; **A2**, **B2** und **C2** zeigen die dazugehörigen Negativkontrollen, welche über denselben Zeitraum ohne TGF- β 3 kultiviert wurden; in allen drei Gruppen ist eine deutlich stärkere Blaufärbung der Differenzierungsansätze zu erkennen, dies weist die Bildung negativ geladener sulfatierter Proteoglykane und Glykosaminoglykane nach; alle Maßstabsbalken 100 μ m.

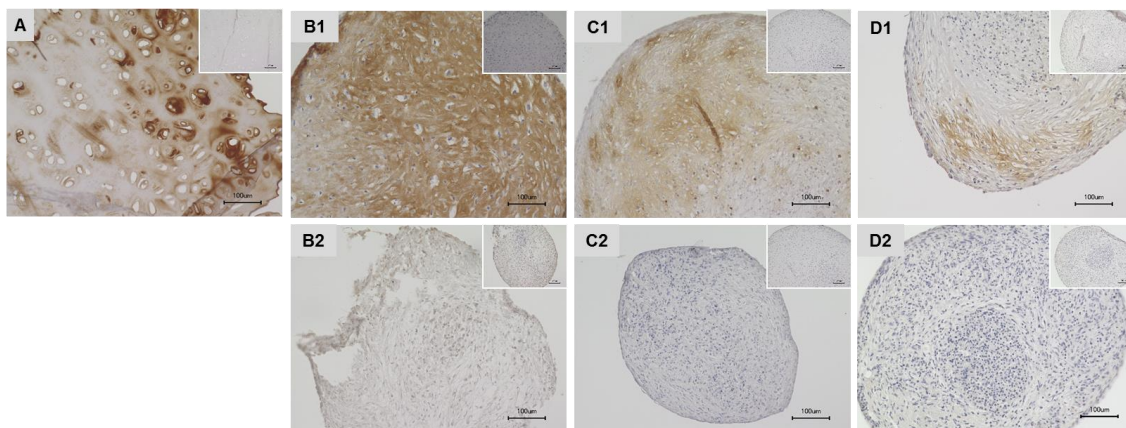


ABBILDUNG 18: CHARAKTERISIERUNG DER HMSCS DURCH DEN NACHWEIS DER PRODUKTION VON KOLLAGEN II BEI CHONDROGENER DIFFERENZIERUNG DURCH IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG.

A zeigt das Präparat eines Nasenknorpels als Positivkontrolle. B, C und D zeigen Präparate aus Gruppe I, Gruppe II bzw. Gruppe III. Die obere Reihe (B1, C1, D1) zeigt jeweils ein Präparat von Zellen, welches mit chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurde, die untere Reihe jeweils die Negativkontrollen der gleichen Probe, welche ohne TGF- β 3 kultiviert wurden. In der rechten oberen Ecke ist jeweils die Isotypkontrolle zum Vergleich gezeigt. Maßstabsbalken jeweils 100 μ m.

3.3.2 OBERFLÄCHENANTIGENE

MSCs zeigen ein charakteristisches Oberflächenantigenmuster, welches beispielsweise durch eine FACS-Analyse nachgewiesen werden kann. Hierfür erfolgte die Färbung der isolierten Zellen in P00 mit Fluoreszenz-gekoppelten Primär-Antikörpern gegen die Antigene CD34, CD90, CD73 und CD105 und die entsprechenden Isotypen sowie die durchflusszytometrische Messung mit dem BD FACSCalibur™.

Für die Auswertung des Versuchs wurden die Zellen zuerst auf die CD34-negativen Zellen eingegrenzt. Diese Zellen (CD34-negativ) wiederum wurden auf die CD90-positiven Zellen eingegrenzt, diese Zellen (CD34-negativ, CD90-positiv) auf CD73-positiven Zellen und alle daraus resultierenden Zellen (CD34-negativ, CD90-positiv, CD73-positiv) dann letztendlich auf CD105-positive Zellen, um schließlich alle Zellen, welche die vier geforderten Eigenschaften erfüllen, ermitteln zu können (Abbildung 19). Durch dieses Vorgehen kann der Anteil der Zellen an allen isolierten Zellen, welche

das gesuchte Oberflächenantigenmuster vorweisen, ermittelt werden. Diese Zellen können gemäß der beschriebenen Minimalkriterien als MSCs bezeichnet werden.

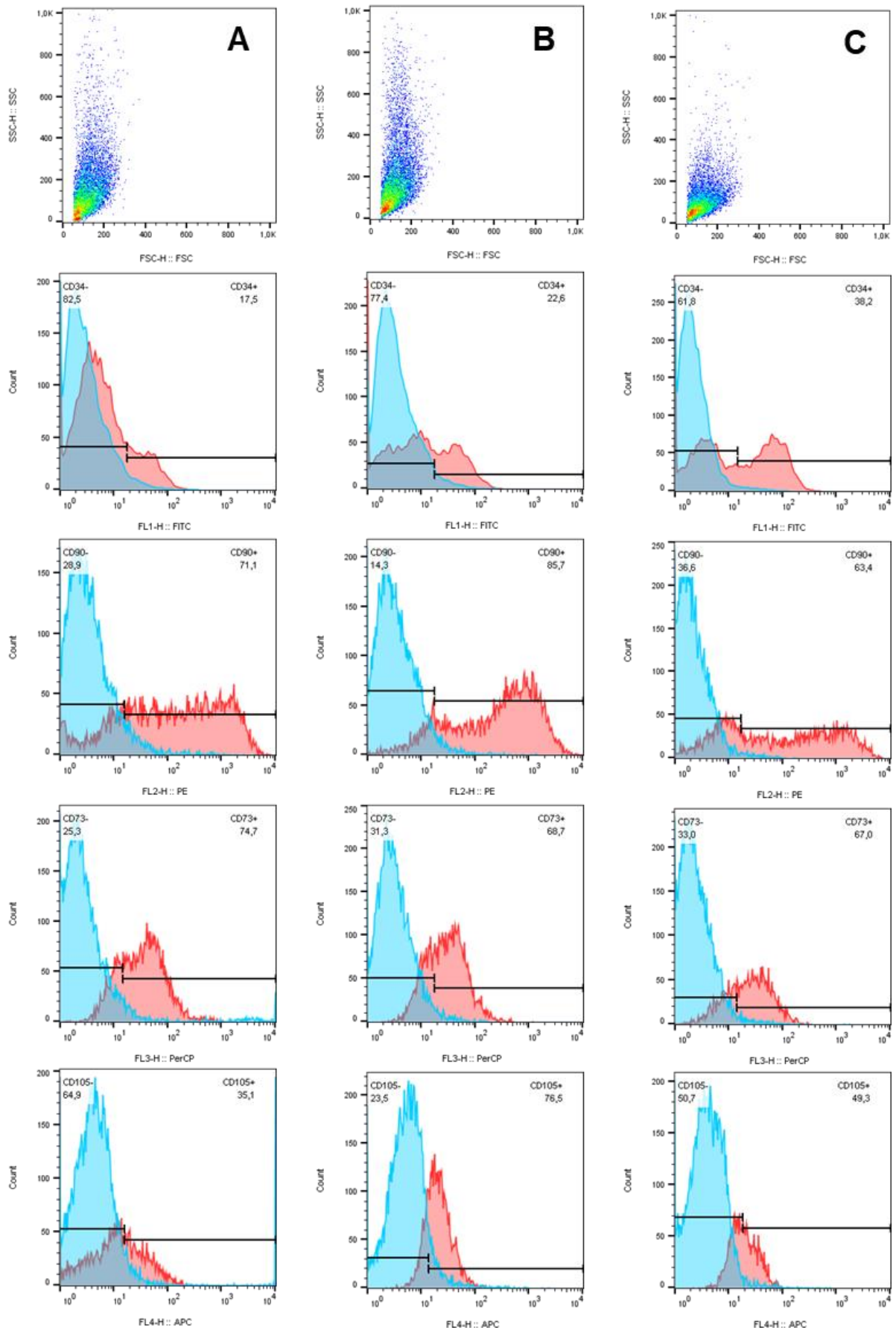


ABBILDUNG 19: VISUALISIERUNG DER ERGEBNISSE DER FACS-ANALYSE

Die Abbildungen **A**, **B** und **C** zeigen exemplarisch jeweils ein Beispiel einer Messung der drei Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppen sind rot dargestellt, die entsprechenden Isotypkontrollen blau. Von oben nach unten erfolgt zunächst die Unterscheidung zwischen CD34-negativen und -positiven Zellen. Diese CD34-negativen Zellen wurden auf die CD90-positiven Zellen eingegrenzt, diese Zellen (CD34-negativ, CD90-positiv) auf CD73-positiven Zellen und alle daraus resultierenden Zellen (CD34-negativ, CD90-positiv, CD73-positiv) dann letztendlich auf CD105-positive Zellen. Hierdurch konnte der Anteil der Zellen mit dem gesuchten Oberflächenantigenmuster an allen isolierten Zellen ermittelt werden.

Es war in allen drei Gruppen möglich, Zellen zu isolieren, welche die Minimalkriterien für MSCs erfüllten. In Gruppe I (akute Rekonstruktion) erfüllten 24,7% die MSC-Kriterien, in Gruppe II (subakute Rekonstruktion) 30,1% und in Gruppe III (verzögerte Rekonstruktion) nur 11,2%. Nach Auswertung dieser Ergebnisse mit einem Chi-Quadrat-Test ist festzustellen, dass in Gruppe II der größte Anteil an Zellen diese Kriterien erfüllt, der Anteil war 5,4% (4,63% - 6,27%, 95% Konfidenzintervall (CI)) höher als in Gruppe I und sogar 18,9% (18,2% - 19,6%, 95% CI) höher als in Gruppe III [141].

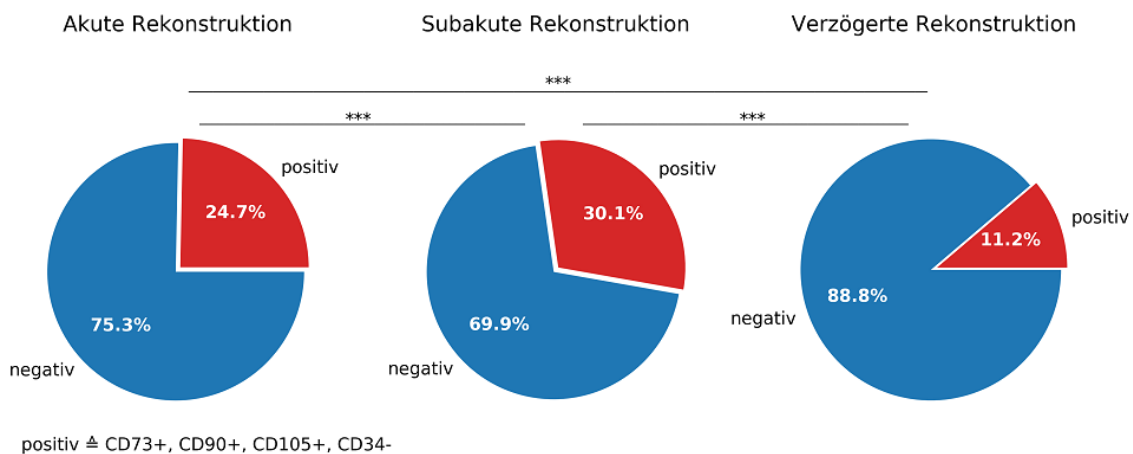


ABBILDUNG 20: ANTEIL DER MSCS AN ALLEN ISOLIERTEN ZELLEN IN P00

Das Diagramm zeigt, den Anteil der MSCs an allen isolierten Zellen in den drei Versuchsgruppen: Gruppe I 24,7%, Gruppe II 30,1% und Gruppe III 11,2%. Die statistische Auswertung mittels eines Chi-Quadrat-Test zeigt, dass der Anteil in Gruppe II um 5,4% (4,63 - 6,27%) höher ist als in Gruppe I und um 18,9% (18,2 - 19,6%) höher ist als in Gruppe III (95% CI, *** entspricht $p = 0,001$) [141].

3.4 ERGEBNISSE DER KULTIVIERUNG DER BANDKONSTRUKTE

Da die bisher beschriebenen Ergebnisse einen Trend dafür bieten, dass die Zellen aus Gruppe II das beste Regenerationspotential haben, wurden für den Versuch der Kultivierung von Bandkonstrukten Zellen aus dieser Gruppe ausgewählt.

3.4.1 MAKROSKOPISCHE BEURTEILUNG

Die makroskopische Beurteilung der Bandkonstrukte erfolgte nach elf und nach 21 Tagen in Kultur. Es wurde der makroskopische Aspekt der Bandkonstrukte, welche mit Zellen kultiviert worden waren, mit dem der Konstrukte, welche ohne Zellen kultiviert worden waren, verglichen. Es ist auffällig, dass die Bandkonstrukte mit Zellen deutlich kompakter imponieren als die ohne Zellen. Zudem sind die einzelnen Kollagenfäden bei Kultivierung mit Zellen nicht mehr gut voneinander abzugrenzen (Abbildung 21 A1-B2). An Tag 21 wurde zusätzlich ein MTT Zellviabilitätstest durchgeführt, um die Viabilität der kultivierten Zellen nachzuweisen (vgl. 2.2.4.3). Hierbei fand eine Reduktion des gelben, wasserlöslichen Substrats MTT in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan statt [142]. Bei den Konstrukten mit Zellen wurde hier deutlich mehr blau-violetter Farbstoff gebildet, insbesondere im Kollagengel, als bei den Konstrukten ohne Zellen (Abbildung 21 B3, B4).

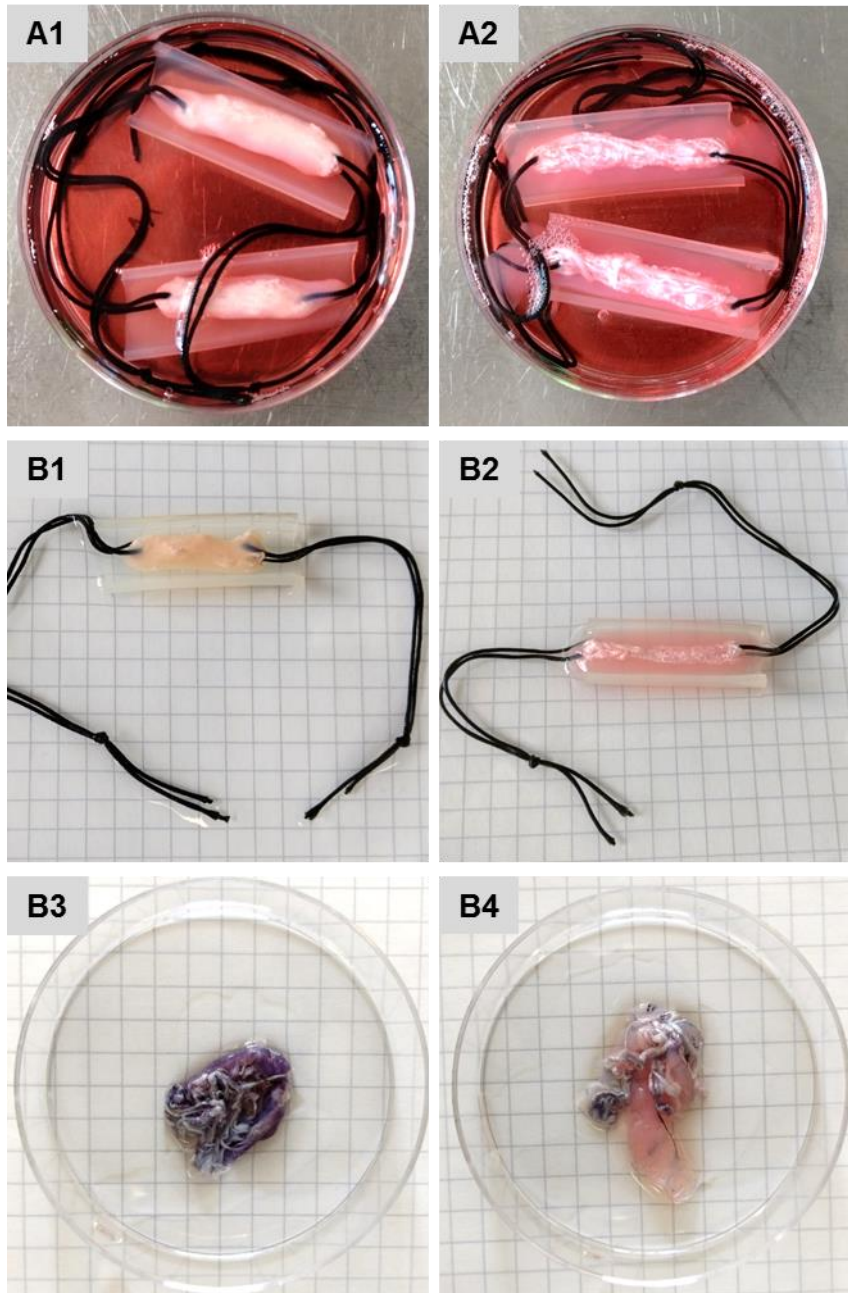


ABBILDUNG 21: MAKROSKOPISCHER ASPEKT DER KULTIVIERTEN BANDKONSTRUKTE AN TAG 11 UND TAG 21 DER KULTIVIERUNG.

A zeigt die Konstrukte an Tag 11 in Kultur: **A1** Bandkonstrukt mit Zellen, **A2** Bandkonstrukt ohne Zellen. **B** zeigt die Konstrukte an Tag 21: **B1** Bandkonstrukt mit Zellen, **B2** Bandkonstrukt ohne Zellen. An Tag 21 wurde zusätzlich ein MTT-Test nach dem Maximalkraftversuch an der Zwick (d.h. nach Zerreißung der Bandkonstrukte) durchgeführt: **B3** Bandkonstrukt mit Zellen, **B4** Bandkonstrukt ohne Zellen.

3.4.2 BIOMECHANIK

Eine der entscheidenden Anforderungen an einen Kreuzbandersatz ist dessen Reißfestigkeit, d.h. die maximale Kraft, die auf das Kreuzband wirken kann, bevor es zerreißt. Bei nativen vorderen Kreuzbändern wurde in verschiedenen Studien eine Maximalkraft von 600 N bis 2.300 N ermittelt [143]. Um dies mit den in dieser Arbeit hergestellten Konstrukten vergleichen zu können, muss die maximale Spannung, also die maximale Kraft pro Fläche, betrachtet werden. Geht man also von einer durchschnittlichen Querschnittsfläche von 42,50 mm² (Männer 48,9 mm², Frauen 36,1 mm²) [8] und einer maximalen Kraft von 1.000 N aus, ergibt sich daraus eine maximale Spannung von 23,53 MPa bzw. N/mm² für ein natives Kreuzband. Dieser Wert kann als Zielwert bei der Herstellung von Bandkonstrukten als VKB-Ersatz gesehen werden.

In Tabelle 26 sind die Messwerte des Versuchs sowie die berechnete Spannung dargestellt. In Abbildung 22 wird die maximale Spannung δ_{\max} , welche bei Anlage der Maximalkraft F_{\max} auf die Bandkonstrukte (Mittelwert aus den Werten der einzelnen Bandkonstrukte mit/ohne Zellen) beziehungsweise ein natives Kreuzband wirkt, dargestellt. Nach 21 Tagen Kultivierung waren beide Konstruktvarianten deutlich weniger reißfest als ein natives Kreuzband. Beim Vergleich der beiden Varianten untereinander ergab sich der Trend ($p = 0,11$), dass die Bandkonstrukte ohne Zellen mit $\delta_{\max} = 6,29 (\pm 0,67)$ MPa stabiler als die Bandkonstrukte mit Zellen $\delta_{\max} = 4,61 (\pm 0,98)$ MPa waren. Der Durchmesser der Konstrukte wurde bei Herstellung ermittelt und bezieht sich dementsprechend auf das Kollagenfaserkonstrukt.

TABELLE 26: ERGEBNISSE DER BIOMECHANISCHEN MESSUNG

Konstrukt	Besiedelung mit/ohne Zellen (mZ/oZ)	Durchmesser [mm]	Fläche Quer- schnitt [mm ²]	F_{\max} [N]	δ_{\max} [125]
K4	mZ	2,5	4,91	19,8	4,03
K7	mZ	2,5	4,91	16,2	3,30
K8	mZ	2,5	4,91	27,6	5,62
K14	mZ	3,0	7,07	38,8	5,49

Konstrukt	Besiedelung mit/ohne Zellen (mZ/oZ)	Durchmesser [mm]	Fläche Quer- schnitt [mm ²]	F _{max} [N]	δ _{max} [125]
K2	oZ	2,5	4,91	33,4	6,80
K1	oZ	2,5	4,91	33	6,72
K13	oZ	3,0	7,07	37,7	5,33
Natives VKB			42,50	1.000	23,53

Biomechanische Testung

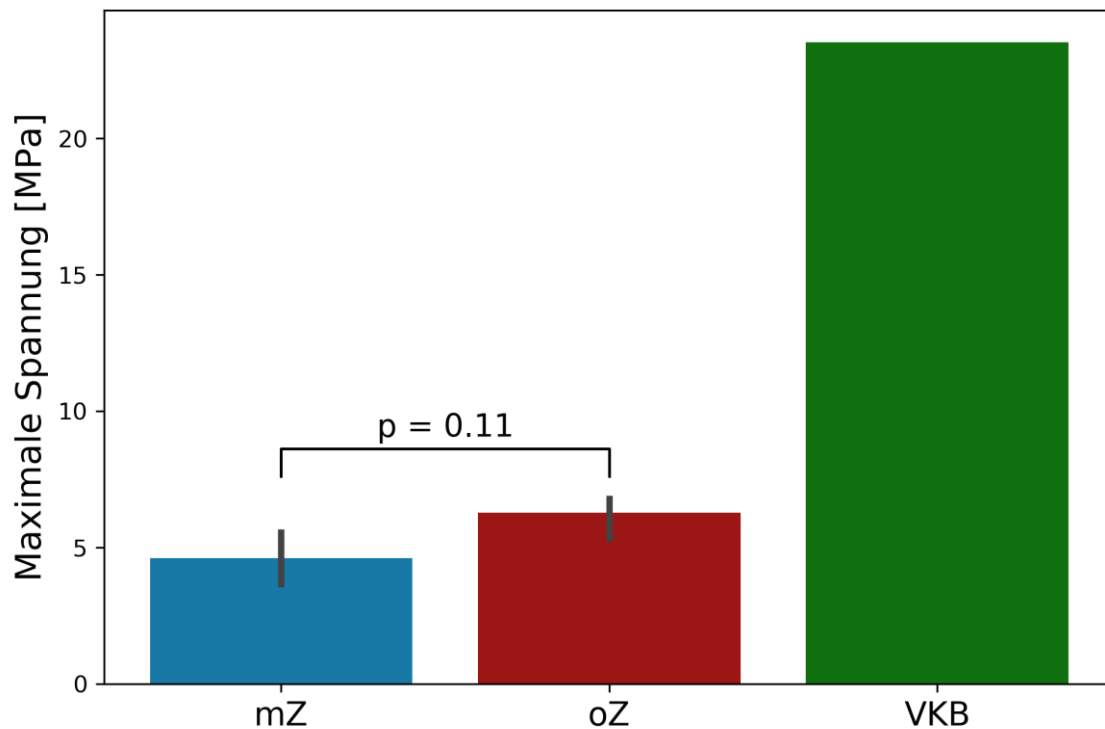


ABBILDUNG 22: MAXIMALE SPANNUNG Δ_{MAX} , WELCHE BEI ANLAGE DER MAXIMALKRAFT AUF DIE BANDKONSTRUKTE BZW. EIN DURCHSCHNITTLICHES NATIVES KREUZBAND WIRKT

Es zeigt sich der Trend (Man Whitney U Test, $p = 0,11$), dass die maximale Spannung δ_{max} (Konstrukte mit Zellen) = $4,61 (\pm 0,98)$ MPa kleiner ist als die maximale Spannung δ_{max} (Konstrukte ohne Zellen) = $6,29 (\pm 0,67)$ MPa. Als Vergleichswert wird die maximale Spannung δ_{max} (natives Kreuzband) = $23,53$ MPa herangezogen.

3.4.3 HISTOLOGISCHE BEURTEILUNG

Zur genaueren Beurteilung der Bandkonstrukte wurden außerdem eine H.E.-Färbung, eine Masson-Goldner-Trichromfärbung sowie immunhistochemische Färbungen gegen Kollagen I durchgeführt.

Die H.E.-Färbung zeigt den Verlauf der Kollagenfasern im Längs- bzw. Querschnitt mit dem umgebenden Kollagengel. Bei den Konstrukten mit Zellen färben sich Zellkerne im Unterschied zu denen ohne Zellen blau. Diese befinden sich besonders im Kollagengel, vereinzelt aber auch zwischen den Kollagenfasern (Abbildung 23). In allen Färbungen ist zu erkennen, dass die Fasern ihre gerichtete Anordnung weitestgehend beibehalten haben.

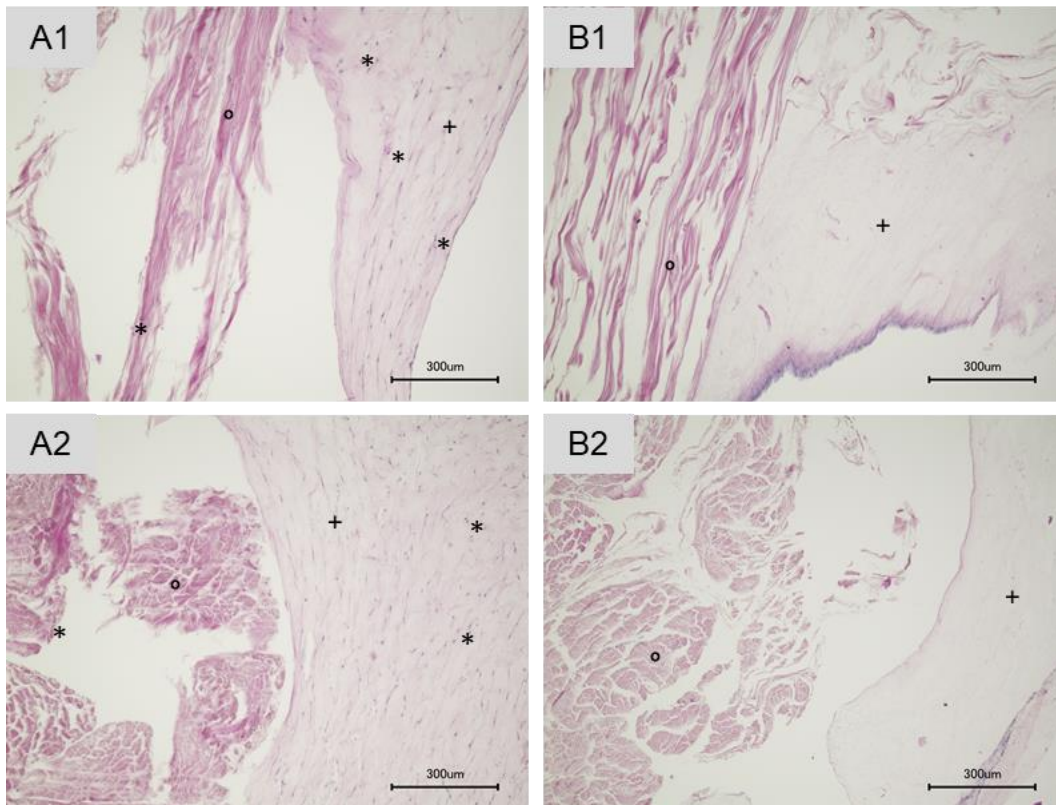


ABBILDUNG 23: ÜBERSICHTSFÄRBUNG DER BANDKONSTRUKTE MIT H.E.

A (A1 Längsschnitt, A2 Querschnitt) mit Zellen, B (B1 Längsschnitt, B2 Querschnitt) ohne Zellen. Zellkerne sind mit „*“ markiert, Kollagenfasern mit „°“, Kollagengel mit „+“. Maßstabsbalken jeweils 300 µm.

Die Masson-Goldner-Trichromfärbung erlaubt eine spezifische Beurteilung des Gewebes. Bei den mit Zellen kultivierten Konstrukten gelingt eine Anfärbung des Kollagengels in grün, wohingegen dieser Bereich bei den Konstrukten ohne Zellen gräulich erscheint. Zusätzlich imponieren die parallel verlaufenden Kollagenfibrillen der Konstrukte mit Zellen stärker in leuchtendem Grün (Abbildung 24).

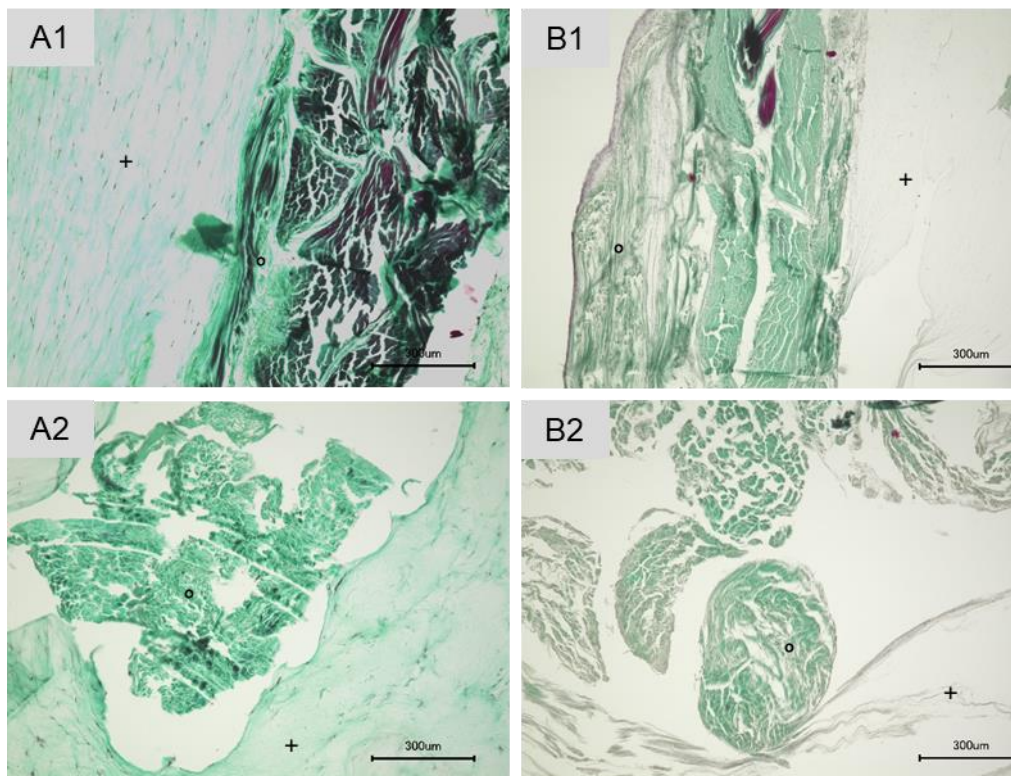


ABBILDUNG 24: ÜBERSICHTSFÄRBUNG DER BANDKONSTRUKTE MIT TRICHRON NACH MASSON GOLDNER

A (A1 Längsschnitt, A2 Querschnitt) mit Zellen, B (B1 Längsschnitt, B2 Querschnitt) ohne Zellen. Markierung von Bereichen mit Kollagenfasern mit „o“ sowie mit Kollagengel mit „+“. Maßstabsbalken jeweils 300 µm.

Die immunhistochemische Färbung diente dem Nachweis von Kollagen I. Die Konstrukte wurden aus Rattenkollagen I hergestellt, dieses ist sowohl bei Konstrukten mit als auch ohne Zellen nachweisbar, jedoch ist die Braunfärbung bei den Konstrukten mit Zellen stärker (Abbildung 25 A). Humanes Kollagen I kann hingegen nur in den Konstrukten mit Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 25 B).

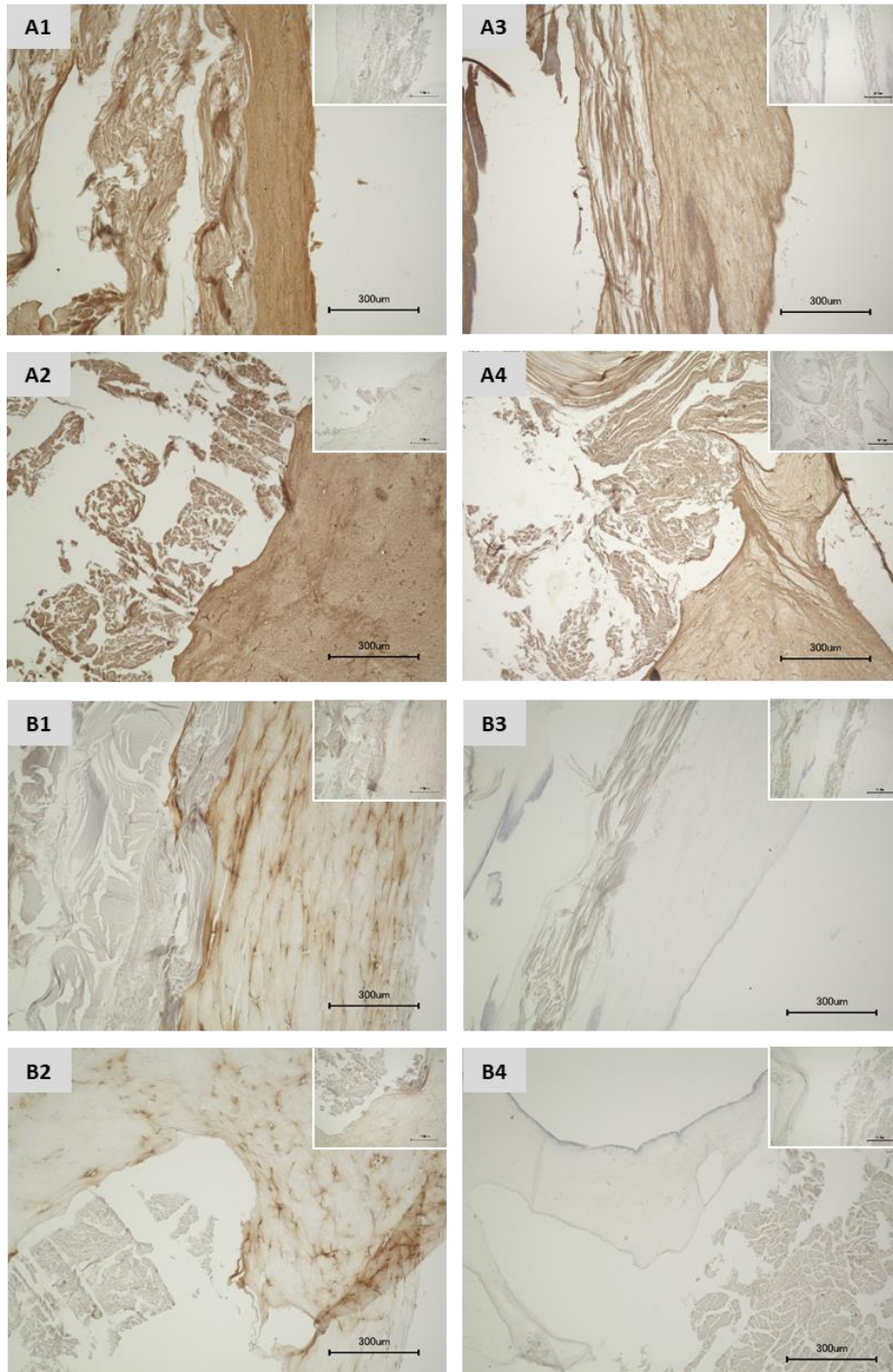


ABBILDUNG 25: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DER BANDKONSTRUKTE GEGEN KOLLAGEN I

Abbildung 25 A zeigt die Färbung gegen rat-Kollagen I (A1 und A2 mit Zellen, A3 und A4 ohne Zellen). Abbildung 25 B zeigt die Färbung gegen hu-Kollagen I (B1 und B2 mit Zellen, B3 und B4 ohne Zellen), alle Maßstabsbalken 300 µm.

4 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob es möglich ist, den Zeitraum nach einer VKB-Ruptur besser einzugrenzen, in dem eine Rekonstruktion aufgrund des Vorkommens besonders vieler MSCs bezüglich des Regenerationspotentials am vielversprechendsten erscheint. Die Motivation zur Verbesserung der aktuell etablierten Therapie einer VKB-Ruptur begründet sich in der großen individuellen [19] wie auch sozioökonomischen Belastung durch die Verletzung [20-22] bei einer weiterhin hohen Rerupturrate von 3,2% bis 11,1% [144, 145] sowie dem Ausbleiben eines klinisch sicher anwendbaren VKB-Ersatzes durch Methoden aus dem Tissue Engineering [146-148]. Die Optimierung der aktuell etablierten therapeutischen Optionen durch die Definition eines zu bevorzugenden Therapiezeitpunktes bietet potenziell die Chance, das Outcome der VKB-Rekonstruktion zu verbessern. Da MSCs durch ihr multilineares Differenzierungspotential entscheidend zum Aufbau und zur Regeneration von Bindegewebe beitragen, ist deren im Bereich einer Verletzung vorzufindende Qualität und Quantität für das Regenerationspotential des Gewebes entscheidend [101, 102, 118]. Demzufolge lag der Fokus der vorliegenden Arbeit im Speziellen auf der Frage, ob Unterschiede in Quantität und Qualität der isolierten MSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ruptur auszumachen sind. Die oben dargestellten Ergebnisse werden im folgenden Kapitel kritisch diskutiert.

4.1 METHODISCHE ÜBERLEGUNGEN

Um die oben genannte Fragestellung zu beantworten, musste zunächst die Einteilung der Biopsien nach Latenz zwischen Ruptur und Entnahme, also VKB-Rekonstruktion, vorgenommen werden. Es erfolgte die Festlegung von drei Zeiträumen. Zhang et al. konnten einen signifikanten Unterschied bezüglich des Anteils an stammzellähnlichen Zellen sowie des Heilungspotentials zwischen Biopsien feststellen, welche bis zu 90 d nach Ruptur und länger als 90 d nach Ruptur gewonnen wurden [90]. In der vorliegenden Arbeit wird hier die Grenze zwischen Gruppe II (subakute Rupturversorgung) und Gruppe III (verzögerte Rupturversorgung) gesetzt. Da während der Regeneration eines Bandes die beiden ersten Phasen, Inflammationsphase und

Proliferations- bzw. Reparationsphase, nach ca. vier Wochen bereits in die dritte und letzte Phase, das Remodelling, übergehen [40, 41], wurde hier eine zweite Grenze zwischen Gruppe I (akute Rupturversorgung) und Gruppe II gesetzt, um zu untersuchen, ob dieser Übergang einen Wendepunkt im Heilungsverlauf und damit der Heilungspotenz darstellt. Darüber hinaus beschrieben Murray et al. vier Phasen der histologischen Veränderung von rupturierten VKBs, welche sich von den Phasen eines spontan heilenden Ligaments unterscheiden. Jedoch wird auch hier herausgestellt, dass die erste Phase, die inflammatorische Phase, nach den ersten Wochen in eine zweite Phase, die Phase der epiligamentären Reparatur, übergeht [149].

Der erste Schritt zur Untersuchung der Eigenschaften der Zellen aus den Biopsien ist deren Isolation aus den intraoperativ gewonnenen humanen VKBs. Ein wesentlicher Faktor war hierbei die Präparation des Ligaments aus der gewonnenen Probe, um nur die im VKB selbst enthaltenden Zellen den verschiedenen Versuchen zuzuführen sowie anschließend die Zahl der isolierten Zellen auf das Gewicht des Ligaments normieren zu können und so eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Biopsien herzustellen. Bei der Probenvorbereitung war es entscheidend darauf zu achten, Synovialmembran, Blutgefäße sowie umgebendes Fettgewebe sorgfältig zu entfernen [98, 137]. Anschließend mussten ein geeignetes Enzym und passende Inkubationsbedingungen zum Verdau des umgebenden Bindegewebes und somit zur Isolierung der Zellen ausgewählt werden. Da die EZM des VKBs vorwiegend aus Kollagenfibrillen besteht, erwies sich Kollagenase als das geeignete Enzym zum Verdau. Hierbei wurde auf das im Institut etablierte Kollagenase-Lyophilisat NB4, welches auch von anderen Arbeitsgruppen so verwendet wird [119], zurückgegriffen. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 24 h, da so ein vollständiger Verdau des Gewebes gewährleistet werden konnte [117].

Zunächst wurden die absolute Zellzahl und die Zellviabilität der isolierten Zellen als Ausgangsbasis bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung der isolierten Zellen, wurde deren Wachstumsverhalten analysiert. Das Wachstumsverhalten lässt letztlich Rückschlüsse auf das Regenerationspotential der Zellen zu.

Außerdem sollten die isolierten Zellen entsprechend der von Dominici et al. definierten minimalen Kriterien für MSCs (vgl. Kapitel 1.3) [92] weiter charakterisiert und untereinander verglichen werden. Die Plastikadhärenz der Zellen ließ sich durch Kultivierung der Zellen in Stammzellmedium und anschließende Mikroskopie nachweisen, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Zur Induktion einer Differenzierung zu Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten erfolgte die Kultivierung der zuvor in Stammzellmedium MSCGM-CD + 2% FCS von Lonza kultivierten Zellen in der 1. Passage in spezifischem, mit Wachstumsfaktoren und Zusätzen supplementiertem Medium. Die erfolgreiche Differenzierung wurde dann durch spezifische histologische Färbungen nachgewiesen. Neben Plastikadhärenz und Differenzierungspotential ist der Nachweis spezifischer Oberflächenantigene essenziell. Diese lassen sich durch verschiedene Methoden darstellen, welchen die Färbung mittels an spezifische Antikörper gekoppelten Farbstoffen zugrunde liegt. In der Literatur findet man zum einen immunhistochemische Färbungen gegen für eine Zellart spezifische Antikörper [98, 118, 119], zum anderen werden Durchflusszytometrie bzw. FACS angewandt [81, 90, 91, 97, 98, 116, 118]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine durchflusszytometrische Analyse durch Vierfachfärbung der isolierten Zellen durchgeführt. So konnte der Anteil der Zellen ermittelt werden, die alle vier geforderten Merkmale zur Definition als MSC (CD73+, CD90+, CD105+, CD34-) erfüllten, was durch eine immunhistochemische Analyse nicht möglich gewesen wäre. Außerdem konnte so eine Verfälschung der Ergebnisse durch vorherige *in vitro* Kultivierung vermieden werden, da die Zellen unmittelbar nach Isolation in P00 für den Versuch verwendet wurden. Dies war entscheidend, da sich sowohl der Anteil der MSCs an der Gesamtzellzahl wie auch das Oberflächenantigenexpressionsmuster durch Kultivierung verändern [118] und unterscheidet die vorliegende Arbeit von den Experimenten anderer Arbeitsgruppen [81, 91]. Zellen wurden dann als MSC definiert, wenn sie positiv für die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 sowie negativ für CD34 waren. Es erfolgte also eine Auswahl der insbesondere für die Fragestellung der Arbeit relevanten Kriterien [92]. Entscheidend hierfür war einerseits, dass durch Ogata et al. ein hohes Level an CD90 und CD73 speziell in VKB-MSCs nachgewiesen werden konnte

[118]. Ebenso ist bekannt, dass CD73-positive Zellen besonders stark an der Ligamentogenese beteiligt sind [118]. Des Weiteren sollte eine Abgrenzung zu CD34-positiven vaskulären Stammzellen [122, 135, 150] erfolgen, welche ebenfalls aus VKB-Biopsien isoliert werden können [122]. So konnte der Anteil der MSCs an allen isolierten Zellen zum Zeitpunkt direkt nach Isolation möglichst genau ermittelt werden. Verschiedene Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass die Beteiligung von MSC bei Anwendung eines VKB-Scaffolds positive Effekte auf die Heilungstendenz mit sich bringt [127, 130]. Um die isolierten und in Stammzellmedium kultivierten Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit, die Ligamentogenese zu beeinflussen, weiter zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Bandkonstrukt entwickelt. Dabei orientierte sich die Arbeit an einer Vorarbeit aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg von Klug [139]. Es wurde Kollagen I als Grundsubstanz gewählt, um die Beschaffenheit eines VKBs gut nachzubilden [10]. Es sollte untersucht werden, inwieweit die isolierten Zellen ein Bandkonstrukt, welches mit einem allogenen oder autologen Sehnentransplantat vergleichbar ist, beeinflussen. Um die Zellen neben der Kultivierung auf Kollagen I-Konstrukten zur Ligamentogenese anzuregen, erfolgte die Kultivierung in tendogenem Kultivierungsmedium [140]. Es schlossen sich biomechanische sowie histologische Versuche an, um die These zu überprüfen, dass die isolierten VKB-MSCs die Beschaffenheit eines Kollagen I-basierten Bandkonstrukt verändern.

4.2 EINFLUSS DER LATENZ ZWISCHEN RUPTUR UND BIOPSIEENTNAHME AUF DIE ISOLIERTEN ZELLEN

Vor Durchführung der beschriebenen Experimente, welche die Eigenschaften der isolierten Zellen charakterisieren sollten, war es wichtig, die Basisparameter der verwendeten Proben miteinander zu vergleichen. Bezüglich Alter und Geschlecht der Probanden ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich die Grundvoraussetzungen zwischen den Gruppen nicht unterscheiden (vgl. Abbildung 7, Abbildung 8).

Betrachtet man zunächst nur die absolute Zellzahl sowie die Zellviabilität der isolierten Zellen, kann kein Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt werden (vgl. Abbildung 9, Abbildung 14). Demzufolge ist anzunehmen, dass sich die Ausgangsbedingungen zwischen den drei Gruppen nicht signifikant unterscheiden und die Untersuchungsergebnisse hierdurch auch nicht verfälscht werden. Andererseits ist dies auch ein Hinweis darauf, dass die interindividuellen Unterschiede sehr groß sind, was die potenziell vorliegenden Unterschiede im zeitlichen Verlauf verschleiern könnte. Diese Problematik wurde auch durch eine andere Arbeitsgruppe beschrieben [91].

Es gelang, unabhängig von der seit Verletzung vergangenen Zeit, Zellen aus den VKB-Biopsien zu isolieren, welche den Kriterien für MSCs entsprachen. In jeder der drei Gruppen war es möglich, Plastikadhärenz, Differenzierung in die osteogene, adipogene und chondrogene Zellreihe sowie ein spezifisches Oberflächenantigenmuster nachzuweisen (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20).

Wie in Abbildung 20 zu erkennen, konnte der größte Anteil an Zellen, welche die MSC-Kriterien erfüllen, in Gruppe II (subakuten Versorgung) nachgewiesen werden. Der Anteil war um 4,63% bis 6,27% höher als in Gruppe I (akute Versorgung) (95% Confidence Interval (CI)) und sogar um 18,2 bis 19,6% höher als in Gruppe III (verzögerter Versorgung) (95% CI). Ebenso ist anzunehmen, dass das Proliferationspotential und die Plastikadhärenz in Gruppe II höher sind als in den anderen beiden Gruppen. Dies zeigt sich insbesondere bei der Untersuchung des Wachstumspotentials der Zellen (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Die Zellen aus Gruppe II erreichen schon nach 9-12 Tagen eine vollständige Konfluenz in Kultur (Abbildung 12 B), wohingegen diese Zellen der Gruppe I erst nach 13-15 Tagen (Abbildung 11 C) und Zellen der Gruppe III diese häufig überhaupt nicht erreichen, weil sie sich vor vollständiger Konfluenz von der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes ablösen (Abbildung 13 C, D). Diese Beobachtungen spiegeln sich in einem starken Trend eines höheren Wachstumspotentials in Gruppe II im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen wider, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben und in Abbildung 10

visualisiert. Die höhere Plastikadhärenz der Zellen der subakuten Versorgungsgruppe zeigt sich zusätzlich im Differenzierungsversuch. Hier war es in den beiden anderen Gruppen jeweils nicht möglich, eine Negativkontrolle für die osteogene Differenzierung anzufertigen, da sich die Zellen stets vor Ablauf der 28 d Kultivierung von der Oberfläche ablösten (Abbildung 16).

Aus den gezeigten Ergebnissen lässt sich als Schlussfolgerung ziehen, dass sich das intraligamentäre und -artikuläre Milieu im Zeitverlauf nach VKB-Ruptur verändert. Insbesondere die Wachstumskurven (Abbildung 10), die höhere Plastikadhärenz (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13) sowie der Anteil an MSCs (Abbildung 20) lassen darauf schließen, dass das Regenerationspotential der Zellen nach Verstreichen der akuten Verletzungsphase und vor Eintreten eines chronischen Zustands am höchsten ist. Grundsätzlich multipotent differenzierungsfähig sind die Zellen zu jedem in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt, eine genaue Quantifizierung wurde bezüglich dieses Aspekts nicht durchgeführt. Eine Abnahme der Quantität und Qualität der MSCs aus dem VKB konnte auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden [81, 90, 91]. Ursache für diese Entwicklung ist möglicherweise, dass bei zu langer Latenz bereits degenerative Prozesse einsetzen, welche auch das Potential der adäquaten Einheilung eines VKB-Ersatzes und damit das Outcome verschlechtern. Dadurch, dass die Selbstheilungstendenz des VKBs so schlecht ist, kann das Band seine stabilisierende Funktion nicht mehr erfüllen. Strukturen, welche nicht mehr verwendet werden, degenerieren. So kommt es nach Rotatorenmanschettenruptur zur fettigen Degeneration des betroffenen Muskels [151, 152] bzw. zur Osteopenie nach Ruhigstellung und Entlastung einer Extremität nach Fraktur oder allgemein reduzierter Belastung [153, 154]. Murray et al. beschäftigte sich zudem mit der Veränderung der histologischen Eigenschaften des VKBs im Verlauf nach Ruptur. Die Arbeitsgruppe konnte feststellen, dass die Phase der Proliferation nach ca. 20 Wochen bis spätestens einem Jahr abgeschlossen ist und in eine Reifungsphase übergeht. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine multilineare Entwicklung nicht mehr in dem Ausmaß möglich ist, wie sie früher im Zeitverlauf möglich gewesen wäre.

Es besteht die Hypothese, dass eine sehr frühe Versorgung einer VKB-Ruptur zu Gelenksteifigkeit und Arthrofibrose führt, wenngleich hier die Studienlage nicht eindeutig ist [82, 87-89]. Es leitet sich hieraus dennoch die Überlegung ab, die VKB-Rekonstruktion nicht unmittelbar in der akuten Verletzungsphase durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei akuter Rupturversorgung ein bezüglich des Regenerationspotentials möglicherweise nachteiliges intraartikuläres Milieu in Bezug auf die isolierten MSCs zu erwarten ist. Betrachtet man die immunmodulatorischen Effekte von MSCs, lässt sich hieraus eine Theorie ableiten, weshalb Qualität und Quantität der isolierten MSCs kurz nach VKB-Ruptur vergleichsweise schlechter sind. Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, tragen MSCs zu einem pro-regenerativen Mikromilieu bei und begrenzen die Gewebszerstörung, indem sie die T-Zell-Antwort sowie deren Expansion durch die Sekretion von verschiedenen bioaktiven Substanzen hemmen [100, 104-106]. Gleichzeitig führt eine Verletzung stets zur Inflammation, welche wiederum erst die Einwanderung verschiedener Zellen induziert und somit unerlässlich für das Einsetzen von Regenerationsmechanismen ist [43, 44]. Man nimmt an, dass erst durch ein ausgeglichenes Verhältnis dieser beiden Mechanismen optimale Bedingungen für die Gewebsregeneration geschaffen werden. [100] Dies könnte erklären, weshalb erst nach Ablauf der akuten Phase die höchste Zahl an regenerationsfähigen MSCs in die VKB-Stümpfe eingewandert ist.

4.3 BEURTEILUNG DER KULTIVIERTEN BANDKONSTRUKTE

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, sollte durch die Experimente mit Bandkonstrukten das Potential der isolierten MSCs zur Ligamentogenese besser beurteilt werden können. Hierzu wurden die Bandkonstrukte hinsichtlich ihrer makroskopischen, histologischen und biomechanischen Eigenschaften untersucht.

Grundsätzlich wird vermutet, dass MSCs einen positiven Effekt auf die Ligamentogenese und insbesondere die VKB-Einheilung haben können. Dies bezieht sich sowohl auf die Kreuzbandplastik als auch die Heilung einer Teilruptur. Meist wurden die Experimente jedoch mit MSCs aus dem Knochenmark durchgeführt,

weshalb diese Erkenntnisse nicht direkt auf VKB-MSCs übertragen werden können [127, 130, 150].

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Kultivierung der Bandkonstrukte (Kapitel 3.4), kann man auch hier feststellen, dass sich die makroskopischen, histologischen und biomechanischen Eigenschaften der Kollagen-I-Bandkonstrukte durch die Kultivierung mit VKB-MSCs im Vergleich zum zellfreien Konstrukt verändern.

Makroskopisch imponieren die mit Zellen kultivierten Bandkonstrukte deutlich kompakter als die ohne Zellen. Dahingegen sind die einzelnen Kollagenfasern bei den ohne Zellen kultivierten Konstrukten noch gut abzugrenzen (vgl. Abbildung 21 A1, A2 vs. B1, B2). Diese Beobachtung lässt sich durch die histologische Untersuchung der Präparate noch bestärken, auch hier imponiert die Dichte der Fasern bei mit Zellen kultivierten Konstrukten deutlich höher (Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Mifune et al. bzgl. der Einheilung der VKB-Plastik in den Knochen bei Anwendung CD34-positiver vaskulärer Stammzellen, welche zuvor aus dem VKB isoliert worden waren [122]. Auch Oe et al. konnten nachweisen, dass MSCs die Zellzahl und Dichte der bindegewebigen Strukturen günstig beeinflusst. In dieser Studie wurde dieser Effekt bei Transplantation von Knochenmark, also MSCs und hämatopoetischer Stammzellen, nachgewiesen [124].

Weitere klare Unterschiede zwischen den mit und ohne Zellen kultivierten Konstrukten sind durch die Viabilitätstestung und die histologischen Untersuchungen herauszuarbeiten. Betrachtet man das Ergebnis des MTT-Tests, in welchem das Vorhandensein lebender Zellen durch die Umwandlung des hellgelben Substrats in dunkelblaues Formazan nachgewiesen wird [142], kann ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (vgl. Abbildung 21 B3, B4). Auch wenn bei den Konstrukten ohne Zellen kein Farbumschlag zu erwarten war, ist auch hier eine schwache Blaufärbung zu erkennen. Es besteht die Vermutung, dass diese Färbung auf eine Kontamination im Rahmen des Zerreißversuches zurückzuführen ist, da für diesen Versuch die Bänder nach Entnahme aus den sterilen Bedingungen und der Zerreißung verwendet worden sind. Trotz dieser Tatsache ist das Ergebnis des MTT-Tests bei den mit Zellen kultivierten Konstrukten deutlich positiv, es sind also

lebende Zellen nachweisbar. Es findet eine Reduktion des blassgelben Farbstoffes, also ein deutlicher Farbumschlag statt, welcher bei den zellfreien Konstrukten in diesem Maß nicht festgestellt werden kann. Die Anwesenheit von Zellen zeigt sich insbesondere auch bei der Auswertung der verschiedenen histologischen Versuche, wie in den Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25 durch Färbemethoden nachgewiesen werden konnte.

Diese Zellen sind jedoch nicht nur Teil des kultivierten Konstrukts, sondern verändern dieses auch. Nach 21 Tagen Kultivierung ist humanes Kollagen I nachweisbar, im zellfreien Konstrukt erwartungsgemäß jedoch nicht (vgl. Abbildung 25 B). Dass die Induktion von MSCs zur Ligamentogenese zur Bildung von unter anderem Kollagen I führt, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [98, 140]. Die vorliegende Arbeit zeigt insbesondere, dass auch VKB-MSCs Kollagen I bilden und somit eine Veränderung an einem Kollagen I-basierten Band induzieren.

Damit das VKB seine Funktion im Kniegelenk erfüllen kann, muss es stabil und reißfest sein. Durch die Kultivierung der Bandkonstrukte mit Zellen, konnte die Reißfestigkeit jedoch zunächst nicht gesteigert werden (vgl. Tabelle 26, Abbildung 22). Es zeigte sich sogar der starke Trend, dass die Reißfestigkeit zunächst abnimmt. Eine initiale Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften eines VKB-Scaffolds beobachtete man auch in verschiedenen anderen Studien. Die Reißfestigkeit eines Scaffolds, welches als Kreuzbandersatz in Minipigs implantiert wurde, hielt vor Implantation einer größeren Zugkraft stand als sechs Wochen nach Implantation. Als Ursache wurde hier ein erhöhter Abbau durch Synovialkollagenase diskutiert [139]. Diese Theorie lässt sich aufgrund des Fehlens dieses Einflussfaktors jedoch nicht auf das Bandmodell dieser Arbeit übertragen. Scheffler et al. entwickelten die Hypothese, dass die zunächst geringere Stabilität nach Kreuzbandrekonstruktion mit mehreren Faktoren zusammenhängt [155]. Er beobachtet, dass sich ab ca. der vierten postoperativen Woche die mechanischen Eigenschaften verschlechtern, Zellproliferation und Bildung von Extrazellulärmatrix jedoch zunehmen [155]. Die Annahme, dass diese Faktoren, die Zelleinwanderung und der steigender Kollagenanteil, eine geringere Stabilität eines Kollagenkonstruktes bedingen könnten,

stützen Scheffler et al. unter anderem auf eine Vorarbeit von Yoshikawa et al. [156]. In deren Arbeit werden die Eigenschaften von unbehandelten und von mit VEGF vorbehandelten Kreuzbandersatzplastiken bei der Anwendung im Schaf verglichen. Hier zeigte sich, dass bei Anwendung von VEGF deutlich mehr Zellen einwanderten und auch die Revaskularisierung deutlich stärker ausgeprägt war. Gleichzeitig wiesen diese Konstrukte signifikant schlechtere mechanische Eigenschaften, wie beispielsweise die maximal ausüb bare Kraft bis zum Zerreißen, auf [156]. Diese Erkenntnisse lassen sich auf die vorliegenden Ergebnisse der Versuche mit den kultivierten Bandkonstrukten insofern übertragen, dass auch hier in den mit Zellen kultivierten Konstrukten die Zellzahl und das Kollagenvorkommen höher waren als in den ohne Zellen kultivierten Konstrukten. Diese Ergebnisse bestätigen also die Hypothese, dass die zugesetzten Zellen und das gebildete Kollagen die nativen Konstrukte verändern und diese deshalb zunächst weniger stabil als native Kollagen I-Bandkonstrukte sind.

4.4 LIMITATIONEN

Nach Betrachtung der Methoden und Ergebnisse der Arbeit, fallen auch einige Limitationen auf, welche bei Diskussion der Arbeit betrachtet werden müssen.

Grundsätzlich handelt es sich um recht kleine Versuchsgruppen mit nur 6 Proben in Gruppe I, 11 Proben in Gruppe II sowie 8 Proben in Gruppe III. Des Weiteren haben interindividuelle Unterschiede einen großen Einfluss auf die Studienergebnisse. Zhang et al. konnten neben dem Timing der Rekonstruktion Alter und Geschlecht des Patienten sowie assoziierte Verletzungen als Einflussfaktoren auf das Regenerationspotential herausarbeiten [90]. Aufgrund vieler weiterer Faktoren, welche Qualität und Quantität der MSCs mutmaßlich beeinflussen, konnten insbesondere in den Versuchen zum Wachstumsverhalten der isolierten Zellen nur starke Trends, jedoch keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Ein weiterer Grund dafür, dass nur wenige statistisch signifikante Ergebnisse erzielt und vielmehr nur Trends festgestellt werden konnten, liegt auch daran, dass das Studiendesign drei verschiedene Versorgungsgruppen vorgesehen hatte. Dadurch musste in der statistischen Auswertung aufgrund des Multiplen Testens immer wieder eine p-Wert-Korrektur durchgeführt werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die

Richtigkeit eines Ergebnisses bei Vergleich aller drei Gruppen miteinander gemindert worden ist [157].

Aus ethischen Gründen war die Gewinnung von Proben gesunder Spender ohne Knieverletzung nicht möglich. Ebenso war es nicht möglich, Proben eines Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten zu gewinnen, um den individuellen zeitlichen Verlauf zu beobachten. Deshalb konnte kein Vergleich der untersuchten Kriterien wie Anzahl der MSCs, deren Wachstums- und Differenzierungspotential und deren Einfluss auf ein Kollagenbandkonstrukt mit einer gesunden Kontrollgruppe bzw. in Bezug auf einen Startzeitpunkt erfolgen. Zusätzlich kann durch das Vorgehen in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden, welche Veränderungen durch die operative Maßnahme der Rekonstruktion intraartikulär erzielt werden und inwieweit die untersuchte präoperative Situation durch den chirurgischen Eingriff verändert wird.

Nicht betrachtet wurde in dieser Arbeit die Genexpression der isolierten Zellen, was eine genauere Charakterisierung und potenziell eine genauere Unterscheidung der Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten möglich gemacht hätte [81, 91]. Ebenso nicht analysiert wurden weitere möglicherweise relevante Zellen wie beispielsweise CD34-positive Stammzellen aus der Umgebung von Gefäßen [138]. Grundsätzlich ist die Untersuchung eines einzelnen Parameters *in vitro* im Vergleich zu einem *in vivo*-Experiment oder einem 3D-Zellkulturmodell weniger aussagekräftig, da hier mehrere Einflussfaktoren gleichzeitig berücksichtigt werden können.

In Anlehnung an die minimalen Kriterien für MSCs, welche von Dominici et al. 2006 veröffentlicht worden sind, wurden in dieser Arbeit vier Oberflächenantigene zur Identifikation von MSCs herausgearbeitet. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass durch diese Definition auch ein gewisser Anteil von Zellen eingeschlossen worden ist, der weitere MSC-Kriterien nicht erfüllt. Hierdurch kann es zu Messungenauigkeiten kommen. Aufgrund der technischen Gegebenheiten war es jedoch nicht möglich, eine weitere Eingrenzung vorzunehmen. Außerdem ist anzunehmen, dass diese mögliche Messungenauigkeit in allen drei Versuchsgruppen gleich groß ist.

Da die Zahl der isolierten Zellen pro mg (vgl. Abbildung 9) und der Anteil an MSCs an allen Zellen (vgl. Abbildung 20) relativ klein war, konnten die Versuche nur mit einer

Mischpopulation durchgeführt werden. Es war nicht möglich, durch FAC-Sorting eine reine MSC-Population für jede Probe zu generieren. Neben dieser Ungenauigkeit konnte trotz größter Sorgfalt bei der Präparation der Proben eine MSC-Kontamination aus Fettgewebe, Synovia und Synovialmembran nicht ausgeschlossen werden [91].

4.5 KLINISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE

Auf zellulärer Ebene zeigt sich der starke Trend, dass in Hinblick auf Qualität und Quantität der MSCs bei subakuter Versorgung einer VKB-Ruptur die besten intraartikulären Voraussetzungen vorliegen. Im Folgenden soll diskutiert werden, ob sich diese Ergebnisse auch auf ein *in vivo* Modell übertragen lassen bzw. welche klinische Relevanz sich ableiten lässt.

Zum einen stellt sich die Frage, inwieweit das Vorkommen von MSCs intraartikulär überhaupt das Regenerationspotential nach VKB-Plastik oder einem anderen rekonstruktiven Verfahren beeinflusst. Therapeutisch wurden MSCs in Form von Knochenmark bereits in Fallserien bei VKB-Teilruptur angewendet. Hier konnte jeweils ein vielversprechendes klinisches bzw. radiologisches Outcome erzielt werden [132, 133]. Allerdings fehlt jeweils eine Kontrollgruppe, welche ohne intraartikuläre oder intraligamentäre Infiltration behandelt worden ist [132, 133]. Wang et al. wendeten MSCs im Rahmen einer kontrollierten doppelblinden randomisierten Studie nach VKB-Rekonstruktion mittels einmaliger intraartikulärer Injektion an. Hierbei konnte eine gute Verträglichkeit bei Verbesserung des subjektiven und klinischen Outcomes sowie Reduktion arthrotischer Veränderungen nach zwei Jahren festgestellt werden [123]. Eine andere Forschungsgruppe injizierte ein Knochenmarksaspirat in die Kreuzbandplastik, klare Ergebnisse sind jedoch noch ausstehend. Insgesamt ist die Frage, welchen Einfluss MSCs bei der Einheilung und Regeneration des VKBs haben, noch nicht abschließend beantwortet. Zusätzlich zu den beschriebenen klinischen Anwendungen gibt es vielversprechende Tiermodelle, in denen der Effekt der MSC-Applikation untersucht worden ist [124, 126]. Über diese experimentellen Anwendungen von Knochenmark und MSCs hinaus konnten Prager et al. VKB-MSCs durch einen TERT-Gentransfer so verändern, dass die Alterungsprozesse der Zellen verlangsamt wurden. Die Arbeitsgruppe deklariert, die Zellen durch die erzielte höhere

Stabilität nun besser untersuchen zu können und erhofft sich, daraus neue Erkenntnisse auch für die Entwicklung neuer therapeutischer Modelle ableiten zu können [158]. Dies verdeutlicht, dass MSCs und VKB-MSCs im Besonderen ein hohes Potential zugesprochen wird, die therapeutischen Möglichkeiten nach VKB-Ruptur zu verbessern.

Da die Latenz zwischen VKB-Ruptur und VKB-Rekonstruktion eine Variable ist, welche in der klinischen Anwendung potenziell beeinflusst werden kann, erscheint es grundsätzlich sinnvoll, das intraartikuläre Milieu nach Ruptur in den verschiedenen Zeitabschnitten zu untersuchen. Anschließend kann eine Modifikation des therapeutischen Vorgehens anhand der Ergebnisse stattfinden. Andere Einflussfaktoren wie Alter und Geschlecht des Patienten [90] sind dagegen nicht veränderbar.

Letztlich ist jedoch neben des Wissens um das generell vorhandene regenerative Potential von VKB-MSCs entscheidend, ob eine Modifikation des therapeutischen Vorgehens auch einen signifikanten Unterschied bezüglich des Outcomes erwirkt. Insgesamt ist die Studienlage hierzu sehr inkonsistent, besonders aufgrund sehr unterschiedlich gewählter Zeitspannen, welche als „frühe“ oder „verspätete“ Versorgung bezeichnet werden [80]. Betrachtet man jedoch die einzelnen Untersuchungen, sind durchaus Unterschiede zu beobachten. Åhlén et Lidén beschrieben in ihrer Studie einen signifikant höheren Lysholm-Score bzw. einen signifikant höheren Tegner Activity Score zwei Jahre nach Semitendinosusplastik bei Versorgung innerhalb von 5 Monaten nach Ruptur im Vergleich zu über 2 Jahren nach Ruptur. Zu diesem Zeitpunkt konnten jedoch keine Unterschiede bzgl. beispielsweise des Lachmann-Tests, Messungen mit dem KT 1000 Arthrometer oder des Bewegungsausmaßes festgestellt werden [86]. Eine Folgestudie der Arbeitsgruppe zeigte, dass 10 Jahre postoperativ die Gonarthrose rate bei späterer Versorgung deutlich höher war. Initial waren hier noch keine signifikanten Unterschiede festzustellen [84]. Auch Karlsson et al. kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier wurden die Ergebnisse nach Patellarsehnenplastik untersucht, die Intervalle wurden als innerhalb von 3 Monaten oder nach 2 Jahren nach Ruptur festgelegt. Außerdem

stellte die Forschungsgruppe ein signifikant höheres Vorkommen von Meniskusschäden bei verspäteter Versorgung fest [159]. Smith et al. dagegen verneinten in einer Metaanalyse einen Zusammenhang zwischen klinischem Outcome und Versorgungszeitpunkt. Jedoch wurde hier als frühe Versorgung eine Versorgung innerhalb von 3 Wochen und als späte Versorgung eine Versorgung nach mindestens 6 Wochen bis zu ca. 2 Jahren bezeichnet [160]. Eine Versorgung nach 3 oder nach 6 Wochen nach Ruptur unterscheidet sich nur sehr wenig. Zusätzlich beinhaltet die Gruppe der späten Versorgung wiederum eine sehr große Zeitspanne. Es ist also möglich, dass die interindividuellen Unterschiede im Vergleich relevanter waren und so keine signifikanten Unterschiede bzgl. des Outcomes zugelassen haben. Was sich jedoch aus dieser Studie ableiten lässt, ist, dass kein höheres Arthrofibrosierisiko bei sehr früher Versorgung besteht [160]. Neuere Verfahren wie Ligament bracing und Healing response werden aktuell meist nur innerhalb der ersten drei bis sechs Wochen nach VKB-Ruptur angewandt, weshalb hier keine Aussage bzgl. eines Zusammenhangs zwischen Latenz nach Ruptur und Outcome möglich ist [70, 78, 161].

Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit dem Outcome zu korrelieren, müsste nun also eine klinische Studie durchgeführt werden, in der die Gruppeneinteilung wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt.

4.6 AUSBLICK

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass das Timing der VKB-Rekonstruktion potenziell die Einheilung der VKB-Plastik bzw. die Regeneration des Gewebes durch das Vorkommen von VKB-MSCs verbessern kann. Um die Validität dieser Hypothese zu stärken, wären verschiedene Folgearbeiten denkbar.

Zunächst erscheint es sinnvoll, die Versuchsgruppen noch zu vergrößern, um den Einfluss der interindividuellen Unterschiede zu minimieren. Außerdem wäre es möglich, die isolierten Zellen noch genauer zu untersuchen, beispielsweise hinsichtlich ihrer Genexpression zu den verschiedenen Zeitpunkten [81, 91]. Neben den isolierten VKB-MSCs gibt es weitere Bestandteile des intraartikulären Milieus, welche das Regenerationspotenzial möglicherweise beeinflussen. Matsumoto et al. konnten beispielsweise CD34- und CD146-positive Stammzellen aus VKB-Biopsien isolieren und

zeigen, dass auch diese ein hohes Regenerationspotential und Differenzierungspotential besitzen [138]. CD34-positiven Zellen wird insbesondere bei der Gefäßneubildung im Heilungsverlauf eine entscheidende Rolle zugesprochen [122]. Als die Regeneration des Gewebes beeinflussende Faktoren sind außerdem verschiedene Wachstumsfaktoren, Cytokine und weitere Mediatoren bekannt, deren Konzentration dementsprechend zusätzlich eine Auswirkung auf die Heilung haben kann [162, 163].

Neben der Untersuchung der genannten Faktoren im Einzelnen, welche nur begrenzt aussagekräftig für die Vorgänge im menschlichen Organismus sind, wäre ebenso die Entwicklung eines *in vitro*-Modells in Anlehnung an den Versuch der Bandkonstrukte denkbar. Zum einen wäre es möglich, diesen Versuch für jede der drei Gruppen einzeln zu wiederholen. Hier wäre insbesondere eine längere Versuchsdauer interessant. Zudem könnten neben der Monokultur auch Co-Kulturen angelegt werden und verschiedene weitere Mediatoren getestet werden, um ein Modell zu entwickeln, welches die Situation *in vivo* besser nachbildet. Hierzu beitragen könnte auch eine Kultivierung unter dynamischen Bedingungen, welche die Situation der postoperativen Rehabilitation besser imitiert.

Neben weiteren laborchemischen Untersuchungen und *in vitro*-Experimenten ist eine Überprüfung der Hypothese *in vivo* durch eine klinische Studie denkbar. Hier ist die Einteilung der Patienten in die drei untersuchten Zeiträume sinnvoll, um dann das klinische Outcome mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Besonders interessant wäre es hierbei, Methoden ohne VKB-Ersatzplastik wie Healing Response oder Ligament Bracing, welche aktuell nur in einem sehr kurzen Zeitraum nach Ruptur angewandt werden, auch zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen und schließlich die Ergebnisse zu vergleichen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die VKB-Ruptur ist eine häufige Verletzung und bedeutet eine große individuelle und sozioökonomische Belastung. Bei hohen Rerupturraten (3,2 bis 11,1%) besteht die Motivation, die etablierten Therapieverfahren durch die Eingrenzung des optimalen Therapiezeitpunktes zu verbessern. In der Annahme, dass MSCs eine bedeutende Rolle bei der Regeneration spielen, sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Zahl und Qualität der aus Kreuzbändern isolierten MSCs sowie der Latenz zwischen VKB-Ruptur und VKB-Rekonstruktion besteht.

Zunächst erfolgte die Zellisolierung aus intraoperativ gewonnenen VKB-Biopsien, welche je nach vergangener Zeit zwischen Ruptur und Rekonstruktion in drei Gruppen eingeteilt worden waren (I \triangleq \leq 30 d, II \triangleq 31-90 d, III \triangleq $>$ 90 d). Zum Nachweis von MSCs erfolgte der Nachweis von Plastikadhärenz, eines multipotenten Differenzierungspotential sowie eines spezifischen Oberflächenantigenmusters (CD73+, CD90+, CD105+, CD34-). Außerdem wurde der Einfluss der Zellen auf die biomechanischen und histologischen Eigenschaften eines Bandkonstruktes untersucht. Der Nachweis von MSCs war in allen drei Gruppen möglich. Das Proliferationspotential war in Gruppe II am größten. Ebenso der Anteil der MSCs an allen Zellen, er war 5,4% (4,63% - 6,27%, 95% Konfidenzintervall (CI); $p < 0,001$) höher als in Gruppe I und sogar 18,9% (18,2% - 19,6%, 95% CI; $p < 0,001$) höher als in Gruppe III. In den Untersuchungen der Bandkonstrukte fiel auf, dass die biomechanische Stabilität bei Kultivierung mit Zellen im Vergleich zu den Konstrukten ohne Zellen abnahm. In der histologischen Analyse konnte nach Kultivierung mit Zellen humanes Kollagen I nachgewiesen werden, was in den Konstrukten ohne Zellen nicht möglich war.

Die erzielten Ergebnisse legen nahe, dass sich das Regenerationspotential im Zeitverlauf verändert und 31-90 d nach Ruptur am höchsten ist. Zu begründen ist dies potenziell damit, dass die Heilung in den ersten Wochen durch Entzündungsprozesse gehemmt wird und im späteren Verlauf degenerative Prozesse einsetzen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen die Eigenschaften eines Bandes verändern. Um diese Annahmen zu bestätigen, müssen jedoch noch weitere Untersuchungen in vitro und in vivo sowie klinische Studien durchgeführt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Benninghoff, A., Drenckhahn, D., *Anatomie*. 17., durchgesehene Auflage ed. 2008, München: Urban & Fischer Verlag.
2. Petersen, W. and B. Tillmann, *Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes*. Der Orthopäde, 2002. **31**(8): p. 710-718.
3. Mochizuki, T., et al., *Cadaveric knee observation study for describing anatomic femoral tunnel placement for two-bundle anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 2006. **22**(4): p. 356-61.
4. Takahashi, M., et al., *Anatomical study of the femoral and tibial insertions of the anteromedial and posterolateral bundles of human anterior cruciate ligament*. Am J Sports Med, 2006. **34**(5): p. 787-92.
5. Clark, J.M. and J.A. Sidles, *The interrelation of fiber bundles in the anterior cruciate ligament*. J Orthop Res, 1990. **8**(2): p. 180-8.
6. Norwood, L.A. and M.J. Cross, *Anterior cruciate ligament: functional anatomy of its bundles in rotatory instabilities*. Am J Sports Med, 1979. **7**(1): p. 23-6.
7. Otsubo, H., et al., *The arrangement and the attachment areas of three ACL bundles*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(1): p. 127-34.
8. Anderson, A.F., et al., *Correlation of anthropometric measurements, strength, anterior cruciate ligament size, and intercondylar notch characteristics to sex differences in anterior cruciate ligament tear rates*. Am J Sports Med, 2001. **29**(1): p. 58-66.
9. Amis, A.A. and R.P. Jakob, *Anterior cruciate ligament graft positioning, tensioning and twisting*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1998. **6 Suppl 1**: p. S2-12.
10. Petersen, W. and B. Tillmann, *Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint*. Anatomy and Embryology, 1999. **200**(3): p. 325-334.
11. Reuben, J.D., et al., *Three-dimensional dynamic motion analysis of the anterior cruciate ligament deficient knee joint*. Am J Sports Med, 1989. **17**(4): p. 463-71.
12. Takeda, Y., et al., *Biomechanical function of the human anterior cruciate ligament*. Arthroscopy, 1994. **10**(2): p. 140-7.
13. Markolf, K.L., J.S. Mensch, and H.C. Amstutz, *Stiffness and laxity of the knee--the contributions of the supporting structures. A quantitative in vitro study*. J Bone Joint Surg Am, 1976. **58**(5): p. 583-94.
14. Inoue, M., et al., *Treatment of the medial collateral ligament injury. I: The importance of anterior cruciate ligament on the varus-valgus knee laxity*. Am J Sports Med, 1987. **15**(1): p. 15-21.
15. Fromm, B. and W. Kummer, *Nerve supply of anterior cruciate ligaments and of cryopreserved anterior cruciate ligament allografts: a new method for the differentiation of the nervous tissues*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1994. **2**(2): p. 118-22.
16. Halata, Z. and J. Haus, *The ultrastructure of sensory nerve endings in human anterior cruciate ligament*. Anat Embryol (Berl), 1989. **179**(5): p. 415-21.

17. Hogervorst, T. and R.A. Brand, *Mechanoreceptors in joint function*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(9): p. 1365-78.
18. Zimny, M.L., M. Schutte, and E. Dabiezies, *Mechanoreceptors in the human anterior cruciate ligament*. Anat Rec, 1986. **214**(2): p. 204-9.
19. Bollen, S., *Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage*. Br J Sports Med, 2000. **34**(3): p. 227-8.
20. Griffin, L.Y., et al., *Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies*. J Am Acad Orthop Surg, 2000. **8**(3): p. 141-50.
21. Frank, C.B. and D.W. Jackson, *The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament*. J Bone Joint Surg Am, 1997. **79**(10): p. 1556-76.
22. Drago, J.L., et al., *Incidence and risk factors for injuries to the anterior cruciate ligament in National Collegiate Athletic Association football: data from the 2004-2005 through 2008-2009 National Collegiate Athletic Association Injury Surveillance System*. Am J Sports Med, 2012. **40**(5): p. 990-5.
23. Peat, G., et al., *Population-wide incidence estimates for soft tissue knee injuries presenting to healthcare in southern Sweden: data from the Skane Healthcare Register*. Arthritis Res Ther, 2014. **16**(4): p. R162.
24. Wetters, N., et al., *Mechanism of Injury and Risk Factors for Anterior Cruciate Ligament Injury*. Operative Techniques in Sports Medicine, 2016. **24**(1): p. 2-6.
25. Mall, N.A., et al., *Incidence and trends of anterior cruciate ligament reconstruction in the United States*. Am J Sports Med, 2014. **42**(10): p. 2363-70.
26. Arendt, E. and R. Dick, *Knee injury patterns among men and women in collegiate basketball and soccer. NCAA data and review of literature*. Am J Sports Med, 1995. **23**(6): p. 694-701.
27. Gray, J., et al., *A survey of injuries to the anterior cruciate ligament of the knee in female basketball players*. Int J Sports Med, 1985. **6**(6): p. 314-6.
28. Boden, B.P., et al., *Mechanisms of anterior cruciate ligament injury*. Orthopedics, 2000. **23**(6): p. 573-8.
29. Shimokochi, Y. and S.J. Shultz, *Mechanisms of noncontact anterior cruciate ligament injury*. J Athl Train, 2008. **43**(4): p. 396-408.
30. Walden, M., et al., *Three distinct mechanisms predominate in non-contact anterior cruciate ligament injuries in male professional football players: a systematic video analysis of 39 cases*. Br J Sports Med, 2015. **49**(22): p. 1452-60.
31. Markolf, K.L., et al., *Effects of applied quadriceps and hamstrings muscle loads on forces in the anterior and posterior cruciate ligaments*. Am J Sports Med, 2004. **32**(5): p. 1144-9.
32. Li, G., et al., *The importance of quadriceps and hamstring muscle loading on knee kinematics and in-situ forces in the ACL*. J Biomech, 1999. **32**(4): p. 395-400.
33. Boden, B.P., et al., *Video analysis of anterior cruciate ligament injury: abnormalities in hip and ankle kinematics*. Am J Sports Med, 2009. **37**(2): p. 252-9.
34. Wellsandt, E., et al., *Does Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Improve Functional and Radiographic Outcomes Over Nonoperative Management 5 Years After Injury?* Am J Sports Med, 2018. **46**(9): p. 2103-2112.

35. Grindem, H., et al., *A pair-matched comparison of return to pivoting sports at 1 year in anterior cruciate ligament-injured patients after a nonoperative versus an operative treatment course*. Am J Sports Med, 2012. **40**(11): p. 2509-16.
36. Frobell, R.B., et al., *Treatment for acute anterior cruciate ligament tear: five year outcome of randomised trial*. Bmj, 2013. **346**: p. f232.
37. Fithian, D.C., et al., *Prospective trial of a treatment algorithm for the management of the anterior cruciate ligament-injured knee*. Am J Sports Med, 2005. **33**(3): p. 335-46.
38. Meunier, A., M. Odensten, and L. Good, *Long-term results after primary repair or non-surgical treatment of anterior cruciate ligament rupture: a randomized study with a 15-year follow-up*. Scand J Med Sci Sports, 2007. **17**(3): p. 230-7.
39. Monk, A.P., et al., *Surgical versus conservative interventions for treating anterior cruciate ligament injuries*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **4**: p. Cd011166.
40. Yang, G., B.B. Rothrauff, and R.S. Tuan, *Tendon and ligament regeneration and repair: clinical relevance and developmental paradigm*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2013. **99**(3): p. 203-222.
41. Murray, M.M. and B.C. Fleming, *Biology of anterior cruciate ligament injury and repair: Kappa delta ann doner vaughn award paper 2013*. J Orthop Res, 2013. **31**(10): p. 1501-6.
42. Voleti, P.B., M.R. Buckley, and L.J. Soslowsky, *Tendon healing: repair and regeneration*. Annu Rev Biomed Eng, 2012. **14**: p. 47-71.
43. Hope, M. and T.S. Saxby, *Tendon healing*. Foot Ankle Clin, 2007. **12**(4): p. 553-67, v.
44. Sharma, P. and N. Maffulli, *Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006. **6**(2): p. 181-90.
45. Garner, W.L., et al., *Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons*. Plast Reconstr Surg, 1989. **83**(5): p. 875-9.
46. Juneja, S.C., et al., *Cellular and molecular factors in flexor tendon repair and adhesions: a histological and gene expression analysis*. Connect Tissue Res, 2013. **54**(3): p. 218-26.
47. Miyashita, H., M. Ochi, and Y. Ikuta, *Histological and biomechanical observations of the rabbit patellar tendon after removal of its central one-third*. Arch Orthop Trauma Surg, 1997. **116**(8): p. 454-62.
48. Murray, M.M., et al., *Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold*. J Orthop Res, 2007. **25**(8): p. 1007-17.
49. Frank, C., N. Schachar, and D. Dittrich, *Natural history of healing in the repaired medial collateral ligament*. J Orthop Res, 1983. **1**(2): p. 179-88.
50. Spindler, K.P., et al., *Expression of collagen and matrix metalloproteinases in ruptured human anterior cruciate ligament: an in situ hybridization study*. J Orthop Res, 1996. **14**(6): p. 857-61.
51. Vavken, P. and M.M. Murray, *The potential for primary repair of the ACL*. Sports Med Arthrosc Rev, 2011. **19**(1): p. 44-9.

52. El-Sharkawy, H., et al., *Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties*. J Periodontol, 2007. **78**(4): p. 661-9.
53. Spindler, K.P., et al., *The central ACL defect as a model for failure of intra-articular healing*. J Orthop Res, 2006. **24**(3): p. 401-6.
54. Feagin, J.A., Jr. and W.W. Curl, *Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study*. Am J Sports Med, 1976. **4**(3): p. 95-100.
55. Taylor, D.C., et al., *Isolated tears of the anterior cruciate ligament: over 30-year follow-up of patients treated with arthrotomy and primary repair*. Am J Sports Med, 2009. **37**(1): p. 65-71.
56. Spindler, K.P., et al., *Anterior cruciate ligament reconstruction autograft choice: bone-tendon-bone versus hamstring: does it really matter? A systematic review*. Am J Sports Med, 2004. **32**(8): p. 1986-95.
57. Samuelsson, K., D. Andersson, and J. Karlsson, *Treatment of anterior cruciate ligament injuries with special reference to graft type and surgical technique: an assessment of randomized controlled trials*. Arthroscopy, 2009. **25**(10): p. 1139-74.
58. Sajovic, M., et al., *A prospective, randomized comparison of semitendinosus and gracilis tendon versus patellar tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: five-year follow-up*. Am J Sports Med, 2006. **34**(12): p. 1933-40.
59. Lund, B., et al., *Is quadriceps tendon a better graft choice than patellar tendon? a prospective randomized study*. Arthroscopy, 2014. **30**(5): p. 593-8.
60. Shani, R.H., et al., *Biomechanical Comparison of Quadriceps and Patellar Tendon Grafts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2016. **32**(1): p. 71-75.
61. Kim, S.-J., P. Kumar, and K.-S. Oh, *Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Autogenous Quadriceps Tendon–Bone Compared With Bone–Patellar Tendon–Bone Grafts at 2-Year Follow-up*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2009. **25**(2): p. 137-144.
62. Slone, H.S., et al., *Quadriceps tendon autograft for anterior cruciate ligament reconstruction: a comprehensive review of current literature and systematic review of clinical results*. Arthroscopy, 2015. **31**(3): p. 541-54.
63. Bottoni, C.R., et al., *Autograft Versus Allograft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Prospective, Randomized Clinical Study With a Minimum 10-Year Follow-up*. Am J Sports Med, 2015. **43**(10): p. 2501-9.
64. Streich, N.A., et al., *Reconstruction of the ACL with a semitendinosus tendon graft: a prospective randomized single blinded comparison of double-bundle versus single-bundle technique in male athletes*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008. **16**(3): p. 232-8.
65. Yagi, M., et al., *Double-bundle ACL reconstruction can improve rotational stability*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **454**: p. 100-7.
66. Mayr, H.O., et al., *Single-Bundle Versus Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Comparative 2-Year Follow-up*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2016. **32**(1): p. 34-42.
67. Koga, H., et al., *Mid- to Long-term Results of Single-Bundle Versus Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Randomized Controlled Trial*.

- Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2015. **31**(1): p. 69-76.
68. Lee, S., et al., *Comparison of anterior and rotatory laxity using navigation between single- and double-bundle ACL reconstruction: prospective randomized trial*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(4): p. 752-61.
 69. Lubowitz, J.H., *Editorial Commentary: ACL Reconstruction: Single-Bundle Versus Double-Bundle*. Arthroscopy, 2015. **31**(6): p. 1197-8.
 70. Ateschrang, A., et al., *Recovery of ACL function after dynamic intraligamentary stabilization is resultant to restoration of ACL integrity and scar tissue formation*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2018. **26**(2): p. 589-595.
 71. Raines, B.T., E. Naclerio, and S.L. Sherman, *Management of Anterior Cruciate Ligament Injury: What's In and What's Out?* Indian journal of orthopaedics, 2017. **51**(5): p. 563-575.
 72. Lubowitz, J.H., *Anatomic ACL reconstruction produces greater graft length change during knee range-of-motion than transtibial technique*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2014. **22**(5): p. 1190-5.
 73. Egli, S., et al., *Dynamic intraligamentary stabilization: novel technique for preserving the ruptured ACL*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015. **23**(4): p. 1215-21.
 74. Kohl, S., et al., *A novel technique, dynamic intraligamentary stabilization creates optimal conditions for primary ACL healing: a preliminary biomechanical study*. Knee, 2014. **21**(2): p. 477-80.
 75. Malahias, M.A., et al., *A Narrative Review of Four Different New Techniques in Primary Anterior Cruciate Ligament Repair: "Back to the Future" or Another Trend?* Sports Med Open, 2018. **4**(1): p. 37.
 76. Egli, S., et al., *Five year results of the first ten ACL patients treated with dynamic intraligamentary stabilisation*. BMC Musculoskelet Disord, 2016. **17**: p. 105.
 77. Steadman, J.R., et al., *A minimally invasive technique ("healing response") to treat proximal ACL injuries in skeletally immature athletes*. J Knee Surg, 2006. **19**(1): p. 8-13.
 78. Jorjani, J., et al., *[Medium- to long-term follow-up after anterior cruciate ligament rupture and repair in healing response technique]*. Z Orthop Unfall, 2013. **151**(6): p. 570-9.
 79. Nguyen, D.T., et al., *Intrinsic healing response of the human anterior cruciate ligament: an histological study of reattached ACL remnants*. J Orthop Res, 2014. **32**(2): p. 296-301.
 80. Andernord, D., et al., *Timing of surgery of the anterior cruciate ligament*. Arthroscopy, 2013. **29**(11): p. 1863-71.
 81. Lee, D.H., et al., *Impact of chronicity of injury on the proportion of mesenchymal stromal cells derived from anterior cruciate ligaments*. Cytotherapy, 2014. **16**(5): p. 586-98.
 82. Kwok, C.S., T. Harrison, and C. Servant, *The optimal timing for anterior cruciate ligament reconstruction with respect to the risk of postoperative stiffness*. Arthroscopy, 2013. **29**(3): p. 556-65.

83. Marcacci, M., et al., *Early versus late reconstruction for anterior cruciate ligament rupture. Results after five years of followup.* Am J Sports Med, 1995. **23**(6): p. 690-3.
84. Karikis, I., et al., *The Long-Term Outcome After Early and Late Anterior Cruciate Ligament Reconstruction.* Arthroscopy, 2018. **34**(6): p. 1907-1917.
85. Wu, W.H., T. Hackett, and J.C. Richmond, *Effects of meniscal and articular surface status on knee stability, function, and symptoms after anterior cruciate ligament reconstruction: a long-term prospective study.* Am J Sports Med, 2002. **30**(6): p. 845-50.
86. Ahlen, M. and M. Liden, *A comparison of the clinical outcome after anterior cruciate ligament reconstruction using a hamstring tendon autograft with special emphasis on the timing of the reconstruction.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011. **19**(3): p. 488-94.
87. Hunter, R.E., et al., *The impact of surgical timing on postoperative motion and stability following anterior cruciate ligament reconstruction.* Arthroscopy, 1996. **12**(6): p. 667-74.
88. Bottoni, C.R., et al., *Postoperative range of motion following anterior cruciate ligament reconstruction using autograft hamstrings: a prospective, randomized clinical trial of early versus delayed reconstructions.* Am J Sports Med, 2008. **36**(4): p. 656-62.
89. Shelbourne, K.D., et al., *Arthrofibrosis in acute anterior cruciate ligament reconstruction. The effect of timing of reconstruction and rehabilitation.* Am J Sports Med, 1991. **19**(4): p. 332-6.
90. Zhang, S., et al., *Anterior cruciate ligament remnant tissue harvested within 3-months after injury predicts higher healing potential.* BMC Musculoskelet Disord, 2015. **16**: p. 390.
91. Nohmi, S., et al., *Post injury changes in the properties of mesenchymal stem cells derived from human anterior cruciate ligaments.* Int Orthop, 2012. **36**(7): p. 1515-22.
92. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
93. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
94. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.* Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
95. Caplan, A.I., *Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!* Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(6): p. 1445-1451.
96. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.* Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
97. Cheng, M.T., et al., *Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments.* Cell Prolif, 2009. **42**(4): p. 448-60.

98. Steinert, A.F., et al., *Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1375-88.
99. Phinney, D.G. and D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2896-902.
100. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 341-7.
101. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
102. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
103. Tropel, P., et al., *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow*. Exp Cell Res, 2004. **295**(2): p. 395-406.
104. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha*. J Cell Physiol, 1996. **166**(3): p. 585-92.
105. Maitra, B., et al., *Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation*. Bone Marrow Transplant, 2004. **33**(6): p. 597-604.
106. Beyth, S., et al., *Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2214-9.
107. Ohgushi, H. and A.I. Caplan, *Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering*. J Biomed Mater Res, 1999. **48**(6): p. 913-27.
108. Ohgushi, H., et al., *Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis*. Biomaterials, 2005. **26**(22): p. 4654-61.
109. Kremer, A., et al., *Three-Dimensional Coculture of Meniscal Cells and Mesenchymal Stem Cells in Collagen Type I Hydrogel on a Small Intestinal Matrix-A Pilot Study Toward Equine Meniscus Tissue Engineering*. Tissue Eng Part A, 2017. **23**(9-10): p. 390-402.
110. Proffen, B.L., et al., *Mesenchymal stem cells from the retropatellar fat pad and peripheral blood stimulate ACL fibroblast migration, proliferation, and collagen gene expression*. Connect Tissue Res, 2013. **54**(1): p. 14-21.
111. Murphy, J.M., et al., *Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3464-74.
112. Shake, J.G., et al., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. Ann Thorac Surg, 2002. **73**(6): p. 1919-25; discussion 1926.
113. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. Lancet, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
114. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-41.

115. Kebriaei, P., et al., *Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(7): p. 804-11.
116. Fu, W., et al., *Mesenchymal stem cells reside in anterior cruciate ligament remnants in situ*. Int Orthop, 2016. **40**(7): p. 1523-30.
117. Cheng, M.T., et al., *Comparison of potentials between stem cells isolated from human anterior cruciate ligament and bone marrow for ligament tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(7): p. 2237-53.
118. Ogata, Y., et al., *Anterior cruciate ligament-derived mesenchymal stromal cells have a propensity to differentiate into the ligament lineage*. Regen Ther, 2018. **8**: p. 20-28.
119. Prager, P., et al., *Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Anterior Cruciate Ligament: Characterization and Comparison of Cells from Young and Old Donors*. Knee Surg Relat Res, 2018. **30**(3): p. 193-205.
120. Dulak, J., et al., *Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine*. Acta Biochim Pol, 2015. **62**(3): p. 329-37.
121. Ramdass, B. and P.S. Koka, *Ligament and tendon repair through regeneration using mesenchymal stem cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2015. **10**(1): p. 84-8.
122. Mifune, Y., et al., *Therapeutic potential of anterior cruciate ligament-derived stem cells for anterior cruciate ligament reconstruction*. Cell Transplant, 2012. **21**(8): p. 1651-65.
123. Wang, Y., et al., *Safety, tolerability, clinical, and joint structural outcomes of a single intra-articular injection of allogeneic mesenchymal precursor cells in patients following anterior cruciate ligament reconstruction: a controlled double-blind randomised trial*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 180.
124. Oe, K., et al., *New strategies for anterior cruciate ligament partial rupture using bone marrow transplantation in rats*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(4): p. 671-9.
125. Silva, A., et al., *Is there a role for adult non-cultivated bone marrow stem cells in ACL reconstruction?* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2014. **22**(1): p. 66-71.
126. Kanaya, A., et al., *Intra-articular injection of mesenchymal stromal cells in partially torn anterior cruciate ligaments in a rat model*. Arthroscopy, 2007. **23**(6): p. 610-7.
127. Kouroupis, D., et al., *Generation of stem cell-based bioartificial anterior cruciate ligament (ACL) grafts for effective ACL rupture repair*. Stem Cell Res, 2016. **17**(2): p. 448-457.
128. Lim, J.K., et al., *Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction*. Arthroscopy, 2004. **20**(9): p. 899-910.
129. Takayama, K., et al., *The effect of blocking angiogenesis on anterior cruciate ligament healing following stem cell transplantation*. Biomaterials, 2015. **60**: p. 9-19.
130. Figueroa, D., et al., *Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and collagen type I scaffold in a rabbit model*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2014. **22**(5): p. 1196-202.

131. Proffen, B.L., et al., *Addition of autologous mesenchymal stem cells to whole blood for bioenhanced ACL repair has no benefit in the porcine model*. Am J Sports Med, 2015. **43**(2): p. 320-30.
132. Gobbi, A., L. Bathan, and L. Boldrini, *Primary repair combined with bone marrow stimulation in acute anterior cruciate ligament lesions: results in a group of athletes*. Am J Sports Med, 2009. **37**(3): p. 571-8.
133. Centeno, C.J., et al., *Anterior cruciate ligament tears treated with percutaneous injection of autologous bone marrow nucleated cells: a case series*. J Pain Res, 2015. **8**: p. 437-47.
134. Soon, M.Y., et al., *An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model: a short-term study of the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration*. Am J Sports Med, 2007. **35**(6): p. 962-71.
135. Matsumoto, T., et al., *Acceleration of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament graft using autologous ruptured tissue*. Am J Sports Med, 2012. **40**(6): p. 1296-302.
136. Hunt, T.J., *Editorial Commentary: Animal Trials Using Stem Cells to Enhance Anterior Cruciate Ligament Treatment Are Interesting. But, Why Not More About Us Humans?* Arthroscopy, 2018. **34**(1): p. 343-344.
137. Lee, D.H., et al., *Effect of donor age on the proportion of mesenchymal stem cells derived from anterior cruciate ligaments*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0117224.
138. Matsumoto, T., et al., *Isolation and characterization of human anterior cruciate ligament-derived vascular stem cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(6): p. 859-72.
139. Klug, A., *Biomechanische und zellbiologische Untersuchung zu augmentierten Biomaterial-basierten Kreuzbandkonstrukten*
Mechanical and cell-biological properties of crosslinked kollagen scaffolds for acl reconstruction. 2017.
140. Rothrauff, B.B., et al., *Braided and Stacked Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Tendon and Ligament Tissue Engineering*. Tissue Eng Part A, 2017. **23**(9-10): p. 378-389.
141. Kupczyk, E., et al., *Mesenchymale Stammzellen aus dem rupturierten vorderen Kreuzband - können sie uns den optimalen Operationszeitpunkt anzeigen?* Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie, 2020. **158**(S01): p. 115-116.
142. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
143. Mahapatra, P., S. Horriat, and B.S. Anand, *Anterior cruciate ligament repair - past, present and future*. J Exp Orthop, 2018. **5**(1): p. 20.
144. Gabler, C.M., et al., *Comparison of Graft Failure Rate Between Autografts Placed via an Anatomic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Technique: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression*. Am J Sports Med, 2016. **44**(4): p. 1069-79.
145. Magnussen, R.A., et al., *ACL Graft and Contralateral ACL Tear Risk within Ten Years Following Reconstruction: A Systematic Review*. JBJS Rev, 2015. **3**(1).

146. Perrone, G.S., et al., *Bench-to-bedside: Bridge-enhanced anterior cruciate ligament repair*. J Orthop Res, 2017. **35**(12): p. 2606-2612.
147. Leong, N.L., F.A. Petrigliano, and D.R. McAllister, *Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(5): p. 1614-24.
148. Caudwell, M., et al., *Systematic review of preclinical and clinical studies on scaffold use in knee ligament regeneration*. Curr Stem Cell Res Ther, 2015. **10**(1): p. 11-8.
149. Murray, M.M., et al., *Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82-a**(10): p. 1387-97.
150. Guo, R., L. Gao, and B. Xu, *Current Evidence of Adult Stem Cells to Enhance Anterior Cruciate Ligament Treatment: A Systematic Review of Animal Trials*. Arthroscopy, 2018. **34**(1): p. 331-340.e2.
151. Hebert-Davies, J., et al., *Progression of Fatty Muscle Degeneration in Atraumatic Rotator Cuff Tears*. J Bone Joint Surg Am, 2017. **99**(10): p. 832-839.
152. Fuchs, B., et al., *Fatty degeneration of the muscles of the rotator cuff: assessment by computed tomography versus magnetic resonance imaging*. J Shoulder Elbow Surg, 1999. **8**(6): p. 599-605.
153. Kohrt, W.M., et al., *American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health*. Med Sci Sports Exerc, 2004. **36**(11): p. 1985-96.
154. Bloomfield, S.A., *Disuse osteopenia*. Curr Osteoporos Rep, 2010. **8**(2): p. 91-7.
155. Scheffler, S.U., F.N. Unterhauser, and A. Weiler, *Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008. **16**(9): p. 834-42.
156. Yoshikawa, T., et al., *Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on mechanical characteristics of the semitendinosus tendon graft after anterior cruciate ligament reconstruction in sheep*. Am J Sports Med, 2006. **34**(12): p. 1918-25.
157. Bender, R., S. Lange, and A. Ziegler, *[Multiple testing]*. Dtsch Med Wochenschr, 2007. **132 Suppl 1**: p. e26-9.
158. Prager, P., et al., *Characterization of human telomerase reverse transcriptase immortalized anterior cruciate ligament cell lines*. Biomed J, 2019. **42**(6): p. 371-380.
159. Karlsson, J., et al., *Subacute versus delayed reconstruction of the anterior cruciate ligament in the competitive athlete*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1999. **7**(3): p. 146-51.
160. Smith, T.O., L. Davies, and C.B. Hing, *Early versus delayed surgery for anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review and meta-analysis*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(3): p. 304-11.
161. Achtnich, A., et al., *Acute Proximal Anterior Cruciate Ligament Tears: Outcomes After Arthroscopic Suture Anchor Repair Versus Anatomic Single-Bundle Reconstruction*. Arthroscopy, 2016. **32**(12): p. 2562-2569.

162. Haslauer, C.M., et al., *Expression of modulators of extracellular matrix structure after anterior cruciate ligament injury*. *Wound Repair Regen*, 2014. **22**(1): p. 103-10.
163. Proffen, B.L., J.T. Sieker, and M.M. Murray, *Bio-enhanced repair of the anterior cruciate ligament*. *Arthroscopy*, 2015. **31**(5): p. 990-7.

APPENDIX

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Fläche
A.	Arteria
ACL	Anterior Cruciate Ligament
AEC	Aminoethylcarbazol
AK	Antikörper
AM	anteromediales Bündel
APC	Allophycocyanin
Art.	Articulatio
BK	Bandkonstrukte
BMSC(s)	Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell(s)
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Diff.	Differenzierungspotential
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Eosin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid/ Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-activated cell scanning/ sorting / Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F _{max}	Maximalkraft
g	Gramm
GNL	Gelneutralisationslösung
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
Gy	Gray
h	Stunde
H	Hämatoxylin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradishperoxidase / Meerrettichperoxidase
Hu	Human
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IM	Intermediäres Bündel
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
J.	Jahre
KM	Knochenmark
LCA	Ligamentum cruciatum anterius
Lig. (Ligg.)	Ligamentum (Ligamenta)
L	Liter
m	Meter
M.	Musculus
MCL	mediales Kollateralband
min	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Million
MSC(s)	Mesenchymal Stem Cell(s) (Mesenchymale Stromazelle(n)/ Stammzelle(n))
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid

m/v	Massekonzentration
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
P	Passage
Pa	Pascal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein
PFA	Paraformaldehyd
PL	posterolaterales Bündel
rpm	Rotation pro Minute
s	Sekunde
SOD	Superoxid-Dismutase
SOP	Standard Operating Procedures
TGF- β 3	Transforming Growth Factor β 3
U	atomare Masse
ü. N.	über Nacht
v.a.	vor allem
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VKB	Vorderes Kreuzband
VKB-MS(s)	aus dem vorderen Kreuzband isolierte MSC(s)
v/v	Volumenkonzentration
WK	Wachstumskurve
WST	Water Soluble Tetrazolium
xg	multipliziert mit Fallbeschleunigung $g=9,81 \text{ m/s}^2$
z.B.	zum Beispiel
δ	Spannung

II ABBIDLUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zellisolierung aus einer intraoperativ gewonnenen VKB-Biopsie.....	37
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer.....	39
Abbildung 3 Wellplatte zur Besiedlung zur Erstellung einer Wachstumskurve.....	49
Abbildung 4: Geknüpftes Kollagenfaserband auf einem sogenannten Reiter.....	57
Abbildung 5: Aufbau der Bandkonstrukte.....	58
Abbildung 6: Versuchsaufbau der biomechanischen Messung an der Zwick.....	73
Abbildung 7: Alter der Patienten in den verschiedenen Probengruppen.....	77
Abbildung 8: Geschlechtsverteilung der Patienten in den drei Probengruppen.....	78
Abbildung 9: Anzahl der isolierten Zellen pro mg Gewebe.....	79
Abbildung 10: Wachstumskurven.....	80
Abbildung 11: Kultivierung der Zellen von VKB I.4 im zeitlichen Verlauf.....	82
Abbildung 12: Kultivierung der Zellen von VKB II.10 im zeitlichen Verlauf.....	83
Abbildung 13: Kultivierung der Zellen von VKB III.8 im zeitlichen Verlauf.....	84
Abbildung 14: Zellviabilität nach Isolierung (Passage 00).....	85
Abbildung 15: Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials mittels Ölrotfärbung.....	87
Abbildung 16: Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials mittels Alizarinrot- S-Färbung.....	88
Abbildung 17: Nachweis des chondrogenen Differenzierungspotentials durch Alcianblaufärbung.....	89
Abbildung 18: Charakterisierung der hMSCs durch den Nachweis der Produktion von Kollagen II bei chondrogener Differenzierung durch immunhistochemische Färbung.	90
Abbildung 19: Visualisierung der Ergebnisse der FACS-Analyse.....	93
Abbildung 20: Anteil der MSCs an allen isolierten Zellen in P00.....	93
Abbildung 21: Makroskopischer Aspekt der kultivierten Bandkonstrukte an Tag 11 und Tag 21 der Kultivierung.....	95
Abbildung 22: Maximale Spannung δ_{\max} , welche bei Anlage der Maximalkraft auf die Bandkonstrukte bzw. ein durchschnittliches natives Kreuzband wirkt.....	97
Abbildung 23: Übersichtsfärbung der Bandkonstrukte mit H.E.....	98

Abbildung 24: Übersichtsfärbung der Bandkonstrukte mit Trichrom nach Masson Goldner	99
Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung der Bandkonstrukte gegen Kollagen I100	

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der Spenderdaten der VKB-Biopsien.....	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Lösungen und Chemikalien	19
Tabelle 3: Liste der verwendeten Medien und Lösungen für die Zellkultur	23
Tabelle 4: Liste der verwendeten Lösungen und Chemikalien für Histologie und Immunhistochemie.....	25
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper für die FACS-Analyse	26
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie.....	26
Tabelle 7: Liste aller verwendeten Isotypen	27
Tabelle 8: Liste aller verwendeten Enzyme	28
Tabelle 9: Liste aller verwendeten Kits.....	29
Tabelle 10: Liste aller verwendeten Labormaterialien.....	29
Tabelle 11: Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 12: Liste aller gebrauchten Geräte sowie Ausrüstung.....	31
Tabelle 13: Liste der verwendeten Software	33
Tabelle 14: Paraffineinbettung per Hand	59
Tabelle 15: Paraffineinbettungsprotokoll des Einbettautomaten	60
Tabelle 16: Entparaffinisierung und Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe	60
Tabelle 17: H.E.-Färbeprotokoll.....	62
Tabelle 18: Alcianblau-Färbeprotokoll	64
Tabelle 19: Ölrot-Färbeprotokoll.....	66
Tabelle 20: Alizarinrot-S-Färbeprotokoll	67
Tabelle 21: Masson-Goldner-Trichrom-Färbeprotokoll	68
Tabelle 22: Aufsteigende Alkoholreihe, Dehydrierung	72
Tabelle 23: Gruppe I, Übersicht über die Verwendung der Proben.....	75
Tabelle 24: Gruppe II, Übersicht über die Verwendung der Proben.....	76
Tabelle 25: Gruppe III, Übersicht über die Verwendung der Proben.....	76
Tabelle 26: Ergebnisse der biomechanischen Messung.....	96

IV DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank richtet sich an **Prof. Dr. rer. biol hum. Heike Walles** für die Möglichkeit, meine Promotion am Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin durchzuführen. Vielen Dank für dein Vertrauen und die Unterstützung über die letzten Jahre hinweg.

Weiterhin danken möchte ich **Prof. Dr. med. Rainer Meffert** für die fachliche Bewertung und die Einbindung in das Team der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie Würzburg.

Vielen Dank an **Dr. rer. nat. Jenny Reboredo** und **Dr. rer. nat. Franziska Ehlicke** für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Ohne eure tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung eines Konzepts und im Labor wäre mir diese Promotion nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit. Danke an **Dr. rer. nat. Meike Haddad-Weber** für deine Unterstützung bei der Entwicklung der Bandkonstrukte. Eure fachlichen Ratschläge und Anregungen haben meine Promotion in vielerlei Hinsicht bereichert.

Außerdem danken möchte ich **Dr. med. Kai Fehske** für die Betreuung meiner Doktorarbeit, insbesondere für die Überlassung der Idee für dieses spannende Forschungsthema, für die Vermittlung eines geeigneten Labors und auch für die vielen humanen Kreuzbandproben, die du mir für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hast. Hier geht mein Dank auch an **Dr. med. Jürgen Eichhorn** und sein Team.

Danke an alle Kollegen des Lehrstuhls Tissue Engineering und Regenerative Medizin für die offene und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Mein besonderer Dank geht an **Dr. rer. nat. Antje Kremer, Maximiliane Wußmann, Dr. rer. nat. Andrea Schwab** und **Martina Werner**.

Zu guter Letzt geht mein Dank an die Personen, ohne die ich nie so weit gekommen wäre. **Mama** und **Papa**, ohne eure Unterstützung vom ersten Tag an wäre ich nie die Person geworden, die ich heute bin. Danke an meine Geschwister, **Nora** und **Tobias**, dass ihr mich immer unterstützt und hinter mir steht. Danke **Mischa**, für deinen Rückhalt, deine Motivation und die Diskussionen, die die Arbeit und unser Leben unglaublich bereichern.

VI PUBLIKATIONEN UND KONGRESSTEILNAHMEN

- Kupczyk E, Ehlicke F, Reboredo J, Haddad-Weber M, Meffert RH, Walles H, Fehske K. 2020. Mesenchymale Stammzellen aus dem rupturierten vorderen Kreuzband - können sie uns den optimalen Operationszeitpunkt anzeigen?. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie. 158. 10.1055/s-0040-1717438.
- Kupczyk E (Würzburg), Jakubietz RG, Paul MM, Meffert RH, Hölscher-Doht S. 2020. Behandlung und Outcome einer komplexen Schnittverletzung der Hohlhand Zone 3 im Kindesalter. Fallpräsentation DGH. doi: 10.3205/20dgh45
- Kupczyk E, Jakubietz RG, Meffert RH. Würzburg. 2019. Das axiale Stauchungstrauma des Carpus – Fallbericht über eine seltene und schwere Verletzung. Fallpräsentation VBC.
- Radakovic D, Reboredo J, Helm M, Weigel T, Schürlein S, Kupczyk E, Leyh RG, Walles H, Hansmann J. 2017. A multilayered electrospun graft as vascular access for Hemodialysis. PLoS One eCollection. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185916>