

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

In vitro Untersuchungen zur Rekonstruktion von Meniskusdefekten
mit mesenchymalen Stammzellen eingebettet in
Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Jens Christian Stüber
aus Würzburg

Würzburg, September 2007

Referent: Prof. Dr. med. Jochen Eulert

Koreferent: Priv-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 29.11.2007

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cbfa1	core binding factor alpha 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CMI	Kollagenmeniskusimplantat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMP	Cartilage Oligometric Matrix Protein
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EGF	Epidermal Growth Factor
Elisa	Enzyme linked immuno sorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
et al.	et altera
FBS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure

HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF	Insulin like Growth Factor
IU	Internationale Einheit
kDa	KiloDalton
Kol II	Kollagen II
Kol X	Kollagen X
min	Minute
ml	Millimeter
MLV	Murine Leukemia Virus
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PLA	Polylaktidsäure
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
s	Sekunde
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
TEP	Totalendoprothese
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehung pro Minute
µl	Mikroliter
V	Volt

1 Einleitung	3
1.1 Geschichte der Meniskus Chirurgie	3
1.2 Anatomie des Kniegelenkmeniskus.....	3
1.3 Histologie	5
1.3.1 Zelleigenschaften.....	5
1.3.2 EZM	6
1.4 Biomechanik	7
1.5 Therapieansätze bei Meniskusverletzungen	8
1.5.1 Meniskusresektion	9
1.5.2 Meniskusreparatur	10
1.5.3 Meniskusersatz	10
1.6 Tissue Engineering.....	11
1.6.1 Zellquellen.....	12
1.6.2 Kulturbedingungen	14
1.6.3 Wachstumsfaktoren	15
1.6.4 Trägermaterialien.....	15
1.6.5 Tiermodelle	18
1.7 Fragestellung	19
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ)	21
2.1.1 Isolierung und Kultivierung aus dem Knochenmark	21
2.1.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer	22
2.2 Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukt.....	22
2.2.1 Polylaktidpolymer.....	22
2.2.2 Herstellung des Kollagen I-Hydrogels	23
2.2.3 Herstellung der Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukte	23
2.3 Verteilung des Kollagen I-Hydrogels im Polylaktidpolymer	24
2.4 Optimale Zellkonzentration im Polylaktidpolymer	24
2.5 Chondrogene Differenzierung der Polylaktidkonstrukte.....	24
2.5.1 RT-PCR Analyse.....	25
2.5.2 RNA-Isolierung.....	25
2.5.3 cDNA-Synthese	26
2.5.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	26
2.5.5 Gelelektrophorese.....	27
2.6 Defektheilung im Meniskus mit Polylaktidkonstrukten	28
2.6.1 Im zeitlichen Verlauf.....	28
2.6.2 Chondrogene Differenzierung	29
2.7 Histologie	30
2.7.1 Konservierungs- und Schneidverfahren	30
2.7.2 Histologische Färbungen	31

2.7.3 Immunhistochemische Färbungen	32
2.8 Verwendete Lösungen und Ansätze	33
2.8.1 Kultivierungsmedien.....	33
2.8.2 Färbelösungen	34
2.8.3 Pufferlösungen.....	34
2.8.4 Antikörper-Detektionssystem	35
2.9 Chemikalien und Geräte.....	35
2.9.1 Chemikalien	35
2.9.2 Materialien und Geräte	37
3 Ergebnisse	39
3.1 Natives Meniskusgewebe.....	39
3.2 Verteilung des Kollagen I-Hydrogels im Polylaktidpolymer	40
3.3 Optimale Zellkonzentration im Polylaktidpolymer	41
3.4 Chondrogene Differenzierung der Polylaktidkonstrukte.....	43
3.4.1 Histologie und Immunhistochemie	43
3.4.2 RT-PCR Analysen.....	45
3.5 Defektheilung im Meniskus mit Polylaktidkonstrukten	46
3.5.1 Im zeitlichen Verlauf.....	46
3.5.2 Chondrogene Differenzierung	48
4 Diskussion.....	50
4.1 Wahl der Zellquelle	50
4.2 Wahl des Trägermaterials	51
4.3 Polylaktidkonstrukte.....	54
4.4 Meniskusdefektheilung mit Polylaktidkonstrukten.....	56
4.5 Methodische Aspekte und weiterführende Überlegungen	58
5 Zusammenfassung	60
6 Literaturverzeichnis.....	62

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Meniskuschirurgie

Erstmals 1885 von Annandale (Annandale, 1885) publiziert, erhielt die Meniskuschirurgie erst in den letzten zwei Jahrzehnten weltweite Beachtung. Zwar wies King schon 1936 auf den Zusammenhang zwischen der Meniskusentfernung und der Degeneration des Gelenkknorpels hin, jedoch benötigte es zahlreiche Studien in den 60er und 70er Jahren, um auf die Bedeutung des Kniegelenkmeniskus hinzuweisen (Sweigart et al., 2001). Bis zu diesem Zeitpunkt galt der Meniskus als funktionsloses Überbleibsel der Beinmuskulatur und die Meniskusentfernung als Therapie der Wahl. Erst in den letzten 20 Jahren entstanden neue, wegweisende Therapieformen.

1.2 Anatomie des Kniegelenkmeniskus

Die Funktion des Meniskus spiegelt sich in seiner speziellen Anatomie wieder. Sowohl die Anordnung der Zellen als auch die extrazelluläre Matrix (EZM) lassen auf eine hohe Resistenz gegen Kompressionsdrücke und gegen Zugkräfte schließen.

Zum Ausgleich der Inkongruenz beider Gelenkflächen, den stark gekrümmten Femurkondylen und der flachen Tibiagelenkplatte, ermöglicht der Meniskus durch seine besondere Form eine gleichmäßige Belastung des Gelenkknorpels. Der mediale Meniskus ist C-förmig. Er ist mit der Gelenkkapsel und dem medialen Kollateralband verwachsen (Abb. 1A und B). Dies bedingt aufgrund der Fixpunkte eine geringere Beweglichkeit innerhalb des Gelenkes und hat ein erhöhtes Verletzungsrisiko zur Folge.

Der Ring des lateralen Meniskus ist stärker geschlossen und nur mit der Kapsel verbunden (Abb. 1A und B). Dadurch ist eine stärkere Verschieblichkeit gewährleistet, da er bei Belastung in geringen Grenzen ausweichen kann. Diese strukturellen Eigenschaften reduzieren das potentielle Verletzungsrisiko.

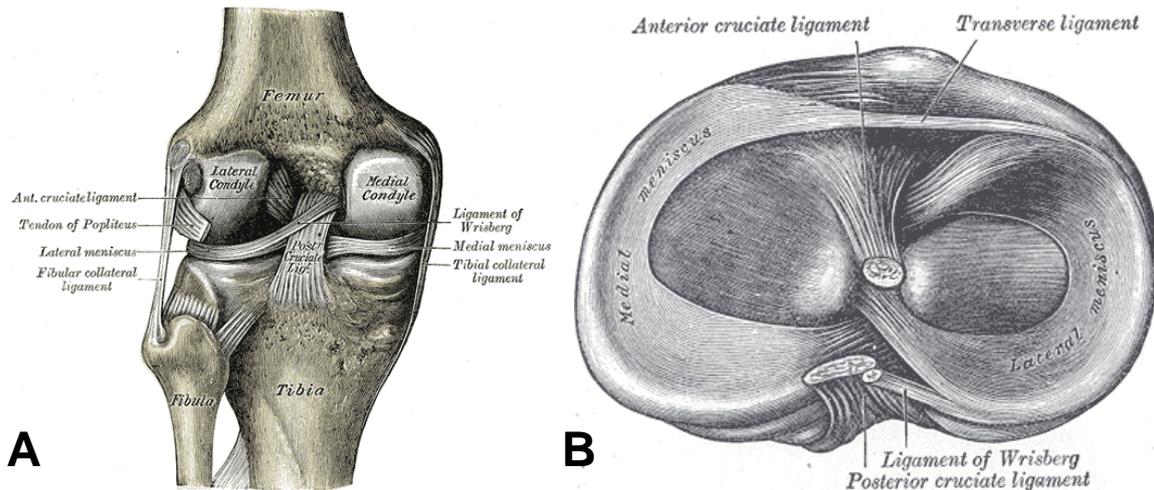


Abb. 1A und B: Anatomie des Kniegelenks (aus 20th U.S. edition of Gray's Anatomy of the Human Body, <http://www.bartleby.com/107/93.html>). A: Ansicht von hinten. B: Ansicht von oben auf das Tibiaplateau.

Die Hörner des Meniskus sind die schmerzempfindsamsten Stellen mit der höchsten Anzahl an Nervenendigungen (Sweigart et al., 2001). Vereinzelt Nervenzellen werden noch in der äußeren, durchbluteten Region gefunden, wohingegen der innere, avaskularisierte Teil keine Innervation aufweist.

Der Meniskus wird in drei Zonen eingeteilt, eine vaskularisierte, eine nicht vaskularisierte und eine dazwischen liegende Übergangszone (Abb. 2). Die Größe der Zonen ist abhängig vom jeweiligen Altersabschnitt. In der Kindheit erfolgt eine Durchblutung des gesamten Meniskus, wohingegen beim Erwachsenen nur noch das äußere Drittel bis zwei Drittel direkt versorgt werden (Sweigart et al., 2001). Der vaskularisierte Teil (Abb. 2A und B, Zone 1 bzw. I) wird von der Synovialmembran bedeckt, welche die Durchblutung gewährleistet. Die innere Zone (Abb. 2A und B, Zone 3 bzw. III) ist nicht vaskularisiert und somit auf die Diffusion angewiesen (Sweigart et al., 2001). Das mittlere Drittel stellt eine Übergangszone von Durchblutungsareal zu Diffusionsareal dar (Abb. 2A und B, Zone 2 bzw. II).

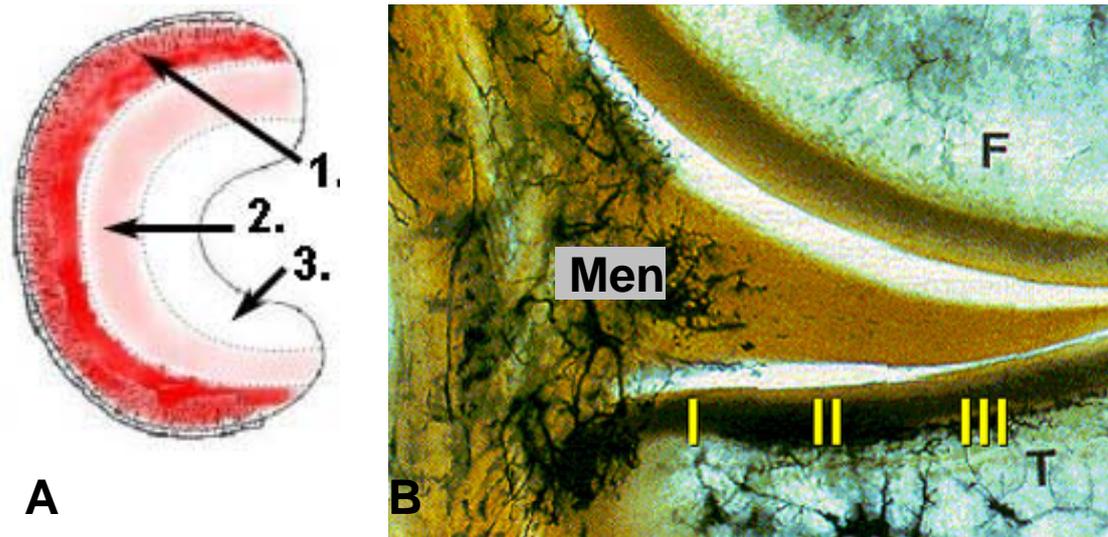


Abb. 2A und B: Durchblutung des Meniskus (aus Arnoczky et al., 1982). A: Dargestellt ist eine schematisches Bild mit 1=vaskularisierter Zone, 2=Übergangszone und 3=nicht vaskularisierter Zone. B: Das Tusche-Präparat zeigt die Durchblutung eines Meniskus mit I=vaskularisierter Zone, II=Übergangszone und III=nicht vaskularisierter Zone. T=Tibia, F=Femur und Men=Meniskus.

1.3 Histologie

1.3.1 Zelleigenschaften

An Hand der Zellmorphologie werden im Meniskus eine oberflächige und tiefe Schicht unterschieden (Sweigart et al., 2001). Die oberflächige besteht aus ovalen oder fusiformen Zellen mit einer geringen Menge an Zytoplasma. Dies führt zu dem optischen Phänomen eines unnatürlich groß aussehenden Nukleus. Die tiefere Schicht besteht aus runden oder polygonalen Zellen. Sie liegen meist alleine, gelegentlich in Zweier- oder Dreiergruppen. Charakteristisch ist eine erhöhte Konzentration an rauhem endoplasmatischen Retikulum.

Die Einteilung der Zellen ist mit Schwierigkeiten verbunden. Zum einen weisen sie Eigenschaften von Fibrozyten in Form eines fibrösen Gewebes auf. Zum anderen besitzen sie Ähnlichkeit von Chondrozyten mit einer umgebenden territorialen Matrix. Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften schlug Webber et al. (1988) die Einteilung der Zellen als „Fibrochondrozyten“ vor.

1.3.2 EZM

Die EZM des Meniskusgewebes kann in vier verschiedene Substanzgruppen unterschieden werden (Herwig et al., 1984):

- Wasser (72%)
- Fibrilläre Komponenten (22% Kollagen)
- Proteoglykane (0,8% Glykosaminoglykane)
- Adhäsions-Glykoproteine

Diese Zusammensetzung ist jedoch in Abhängigkeit von Alter und Lokalisation des Gewebes innerhalb des Meniskus variabel (Sweigart et al., 2001).

Fibrilläre Komponente

Hauptbestandteil der fibrillären Komponente stellt das Kollagen dar. Kollagen bildet mit 60-70% des Trockengewichtes das Grundgerüst des Meniskusgewebes. Die Kollagene kann man in verschiedene Gruppen klassifizieren, wobei Kollagen I den Hauptbestandteil mit durchschnittlich 90% darstellt. Weiterhin sind Kollagen II, III, V und VI von Bedeutung. Untersuchungen zeigten, dass die Konzentrationen der einzelnen Kollagenarten innerhalb des Meniskus stark variieren können (Sweigart et al., 2001).

Die Kollagenfasern haben aufgrund ihrer Funktion eine einzigartige Anordnung innerhalb des Meniskus (Tab. 1).

Oberflächige Schicht	→ zirkuläre Fasern: mechanische Druckverteilung
Mittlere Lammelarschicht	→ zirkuläre Fasern: mechanische Druckverteilung → radiäre Fasern der peripheren anterioren und posterioren Zonen: Fixation an die Gelenkkapsel, Stabilisation der längsorientierten Fasern
Tiefe, kreisförmige Schicht	→ zirkuläre Fasern sowie radiäre Fasern (tie fibers): Druckverteilung und Stabilität

Tab. 1: Faseranordnung im Meniskus (modifiziert nach Petersen et al., 1998).

Proteoglykane

Aufgrund der hohen Wasserbindung sind die Proteoglykane für die ausgeprägte Kompressionsfähigkeit des Meniskus und seine visko-elastischen Eigenschaften verantwortlich. Es können lange Proteoglykane mit einer hohen Wasserbindungsfähigkeit und kurze Proteoglykane, einer Schutzschicht der Meniskuszellen, unterschieden werden. Die Proteoglykane bestehen zu 40% aus Chondroitin-4-sulfat, 10-20% aus Chondroitin-6-sulfat, 20-30% aus Dermatan-Sulfat und 15% aus Keratan-Sulfat (Sweigart et al., 2001).

Adhäsions-Glykoproteine

Sie sind an der Verankerung der jeweiligen Zellen miteinander oder mit Matrixmolekülen beteiligt und bestehen aus Kollagen VI, Fibronectin und Thrombospondin (Sweigart et al., 2001).

1.4 Biomechanik

Unter biomechanischen Gesichtspunkten hat der Meniskus die Aufgabe eines Stossfängers, der die beiden Gelenkpartner, den stark gekrümmten Femurkondylus und die flache Gelenkpfanne des Tibiakopfes, ausgleicht. Er verbessert die Stabilität und vergrößert die Gelenkfläche mit Verringerung der Punktbelastung.

Der Meniskus reagiert zum einen mit Kompression auf Belastung, zum anderen wird er aufgrund seiner Form vom Zentrum des Femurkondylus verschoben. Aufgrund der vorderen und hinteren Befestigung wird eine Spannung aufgebaut (Sweigart et al., 2001). Dank seiner fast kreisförmigen Struktur und somit kleineren Entfernung der Fixpunkte kann der laterale Meniskus im Gegensatz zum C-förmigen Ansatz des medialen Meniskus besser verschoben werden. Zusätzlich ist der mediale Meniskus durch die Verwachsung am medialen Kollateralband in seiner Beweglichkeit eingeschränkt.

Die größte Kontaktfläche des Meniskus mit dem Gelenk ist bei 0° Flexion. Je weiter das Knie gebeugt wird, desto mehr verringert sich die Kontaktfläche und bewegt sich auf der Tibiaplatte nach hinten (Sweigart et al., 2001).

Die exakte Druckverteilung im Knie ist abhängig von der Belastung. Ist diese gering, absorbiert der Meniskus sie nahezu vollständig, wohingegen sich bei zunehmendem Gewicht die Kraftverhältnisse in Richtung Gelenkknorpel verschieben. Unterschiede treten wiederum zwischen den Menisci aufgrund der anatomischen Gegebenheiten auf. So trägt bei 150 kg Belastung der laterale Meniskus noch die meiste Stoßabsorption, wohingegen der mediale nur noch ungefähr 50 % der Belastung trägt und die restliche Kraft auf den Gelenkknorpel wirkt (Sweigart et al., 2001).

Im Falle einer Verletzung oder Entfernung des Meniskus erhöht sich die Belastung des Gelenkknorpels. Wie Hoshino et al. (1987) publizierten, erhöhte sich bei einem radialen Riss im Meniskus die Kraft auf die Tibiaplatte um durchschnittlich 12,8%, bei einer Meniskusentfernung sogar um 20,8%.

1.5 Therapieansätze bei Meniskusverletzungen

Aufgrund der hohen Belastung des Meniskusgewebes treten Verletzungen häufig auf. In den meisten Fällen finden sich Risse, hauptsächlich längliche oder Korbhenkelrisse (Sweigart et al., 2001).

Eingeteilt werden die Meniskusdefekte in verschiedene Kategorien: Korbhenkelrisse, Lappenrisse, Querrisse und Komplexriss (Abb. 3A-D).

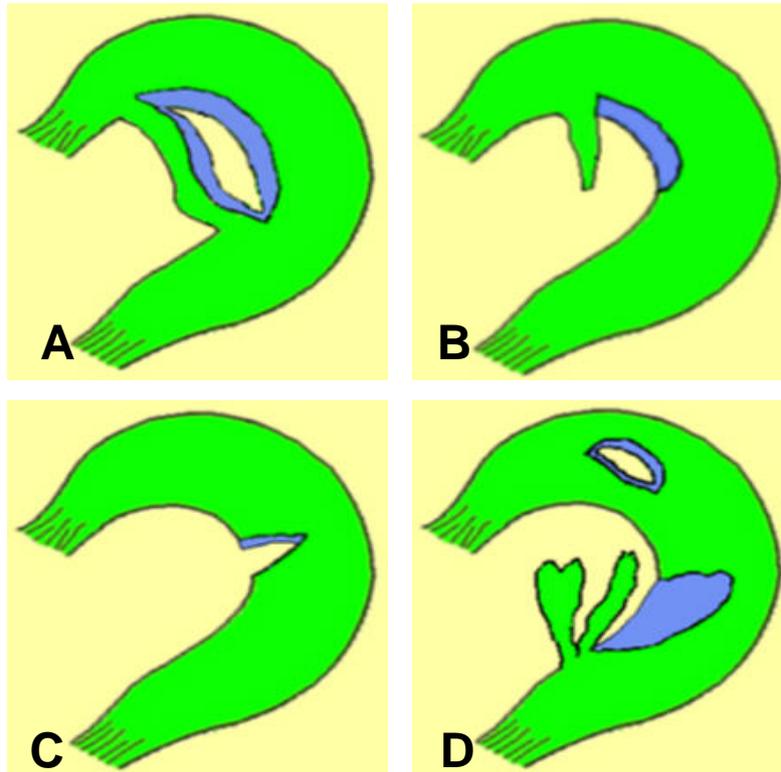


Abb. 3A-D: Dargestellt sind Meniskusdefektarten (aus St. Josefhospital Uerdingen, www.arthro-uerdingen.de/meniskus.html). A: Korbhenkelriss, B: Lappenriss, C: Querriss, D: Komplexriss.

Schon 1936 zeigte King (1936) die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit des Meniskus. Risse des vaskularisierten Gewebes können im Gegensatz zur avaskularisierten inneren Zone selbständig heilen. Bei radialen Rissen mit erhaltener Kollagenstruktur erlangt der Meniskus nach der Heilung seine ursprüngliche mechanische Fähigkeit wieder. Dies ist bei unterbrochener Kollagenstruktur nicht mehr möglich (Sweigart et al., 2001).

1.5.1 Meniskusresektion

Da der Meniskus lange Zeit als nutzloses Überbleibsel eines Fußmuskels galt (Sweigart et al., 2001), wurde er bei Komplikationen radikal entfernt. Obwohl King schon 1936 die negativen Auswirkungen dieses Operationsverfahren darstellte, dauerte es noch Jahrzehnte, bis zahlreiche Studien in den 60er und 70er Jahren die Bedeutung des Meniskus verdeutlichten und sich diese Erkenntnis in den Fachkreisen durchsetzte (Sweigart et al., 2001). Bei größeren

Verletzungen, die nicht mehr primär durch operative Techniken repariert werden können, wird versucht eine Teilresektion des Meniskus durchzuführen.

1.5.2 Meniskusreparatur

Aufgrund der vielfältigen Folgeschäden der Meniskusentfernung wurden zahlreiche Reparaturverfahren, wie diverse Nahttechniken, Meniskuspfeile und Fibrinkleber entwickelt. Zusätzlich entstanden weitere Optimierungen der Therapiemöglichkeiten durch Abrasionsbehandlungen und Gefäßinduktionen.

Das Prinzip der Reparatur zielt auf die lückenlose, stabile Anheftung der beiden Defektregionen, bis eine natürliche Heilung erfolgt ist. Meniskuspfeile und Fibrinkleber sind biologisch abbaubare Produkte, die aufgrund der einfacheren Handhabung im Vergleich zu Nähten konzipiert wurden (Sweigart et al., 2001).

Bei Rissen in der nicht durchbluteten Zone muss zusätzlich eine Gefäßeinsprossung induziert werden, z.B. durch die Bohrung von Kanälen. Dabei wird eine Verbindung zwischen der vaskularisierten Peripherie und der Defektregion geschaffen. Der Nachteil dieser Technik stellt die Unterbrechung der Kollagenstruktur dar.

Die Trephination (Sweigart et al., 2001) ermöglicht eine elegantere Lösung, die durch Anwendung dünnerer Nadeln die Schäden an der Kollagenstruktur minimiert.

1.5.3 Meniskusersatz

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt der Meniskusersatz mit natürlichen oder künstlichen Menisci dar.

Natürliche Gewebe, wie z.B. aus Kollagen sind zur Zeit Hauptbestandteil intensiver Forschungen. Steadman et al. (2005) verwendeten in ihren Studien das Kollagenmeniskusimplantat (CMI), welches aus Kollagen I hergestellt wird. Es wurde so konzipiert, dass Zellen in das Kollagengewebe einwandern können und sich zu Meniskuszellen differenzieren. Seit 2000 besitzt der CMI eine CE-Zulassung. Die Hauptschwierigkeit ist die Befestigung des Gewebes an der Tibiaplatte. Verankerungen mit Knochenstücken erzielen derzeit die besten Ergebnisse, allerdings stimulieren sie nicht die Bildung von natürlichem

Gewebe. Zaffagnini et al. (2007) publizierten die Ergebnisse einer 7-8 jährigen Verlaufskontrolle von CMI-Patienten. Hierbei zeigten sich keine vorzeitigen Kniegelenksarthrosen und die Arbeitsgruppe kam zum Ergebnis einer Reduktion der Abnützung des Gelenkknorpels aufgrund des Meniskusimplantates.

Obwohl Meniskustransplantationen die besten Ergebnisse für bestimmte Defekte, wie z.B. radiale und komplexe Risse liefern, treten laut aktueller Forschungen immer noch Degenerationen des Gelenkknorpels auf (Sweigart et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Ersatz durch körpereigenes Gewebe, z.B. Sehnen mit dem Vorteil einer vorbestehenden kreisförmigen Kollagenstruktur. Das Ziel, die Zellen des Gewebes in Fibrochondrozyten umzuwandeln, ist in der Vergangenheit noch nicht gelungen (Sweigart et al., 2001).

In der Entwicklung von Meniskusprothesen wurden verschiedene Materialien untersucht, wie Polytetrafluoroethylene (PTFE), Dacron und Polyurethan-beschichtete Versionen der beiden vorgenannten Materialien (Sweigart et al., 2001). Obwohl das Polyurethan-beschichtete PTFE die besten Resultate lieferte, waren die Prothesen den natürlichen Geweben mechanisch unterlegen.

1.6 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering stellt eine Alternative zum künstlichen Meniskusersatz dar. Ausschlaggebend ist hier die Kombination von Zellen, Wachstumsfaktoren und einem geeigneten Biomaterial zur Herstellung und Ersatz körpereigenen Gewebes. Die grundlegenden Aspekte lassen sich in 5 Kategorien einteilen:

1. Zellquellen
2. Kulturbedingungen
3. Wachstumsfaktoren
4. Trägermaterialien
5. Tiermodelle

1.6.1 Zellquellen

Grundsätzlich kommen im Bereich der Meniskusforschung verschiedene Zellquellen in Betracht.

Webber et al. (1988) entwickelten Protokolle für die Isolierung von Meniskuszellen, welche in drei verschiedene Populationen unterschieden werden können (Nakata et al., 2001):

- längliche fibroblastenähnliche Zellen
- polygonale Zellen
- kleine runde chondrozytenähnliche Zellen

Diese Populationen unterscheiden sich in der Produktion von Glykosaminoglykanen. Hierbei produzieren Zellen der inneren, nicht durchbluteten Region eine höhere Menge im Vergleich zum peripheren Rand (Sweigart et al., 2001). Aufgrund dieser Forschungsergebnisse kam man zu der Überzeugung, dass nur die im inneren Teil des Meniskushorns zu findenden Zellen für das Tissue Engineering brauchbar sind (Buma et al., 2002). In diesem Bereich steht jedoch nur eine geringe Zellmenge zur Verfügung und die Qualität der Zellen kann durch das jeweilige Trauma vermindert sein.

Eine weitere Zellquelle stellen MSZ aus dem Knochenmark dar. Diese können grundsätzlich in mesenchymales Gewebe differenzieren (Abb. 3) und haben in Bezug auf das Proliferationsverhalten eindeutige Vorteile gegenüber den isolierten Meniskuszellen (Sweigart et al., 2001).

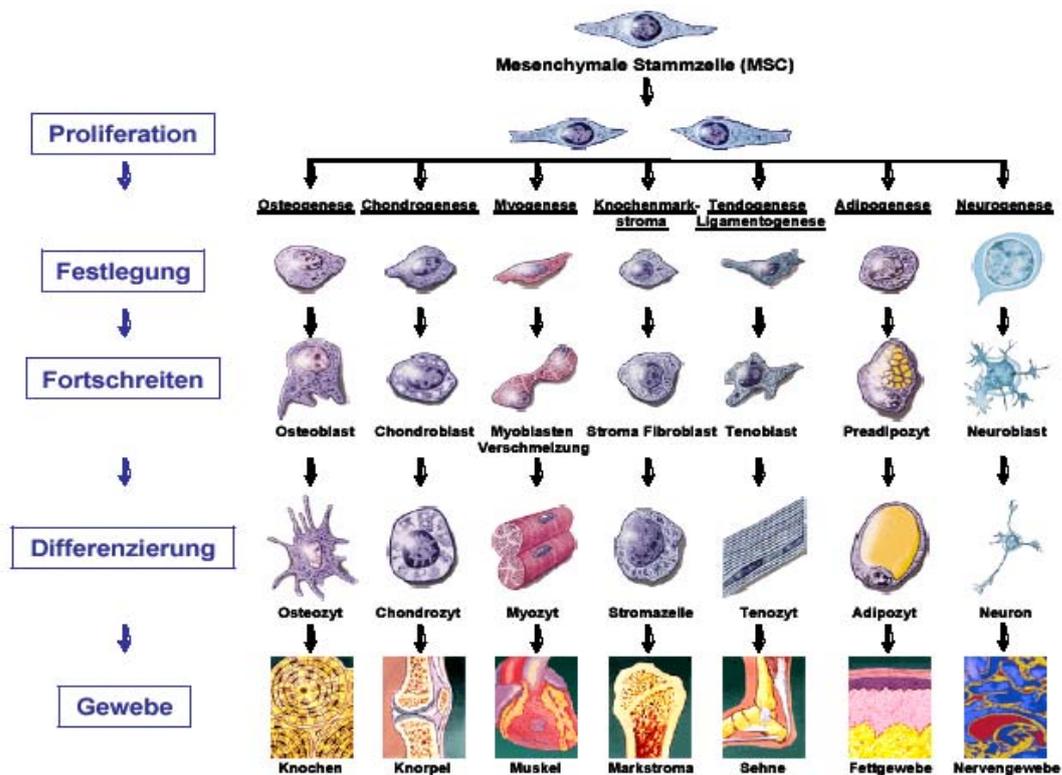


Abb. 3: Differenzierungsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen (aus Caplan et al., 1994).

In der chondrogenen Differenzierung von MSZ werden mehrere Stufen unterschieden, in denen es zur Expression unterschiedlicher Marker kommt. So ist in der RT-PCR der Nachweis von Kol II und Aggrekan schon frühzeitig möglich, wohingegen Kol X erst im späteren hypertrophen Stadium exprimiert wird (Abb. 4).

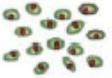
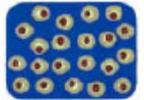
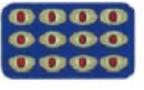
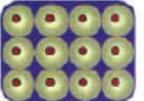
Zelltyp	Erscheinungsbild	ECM Marker	Regulatorische Marker
Mesenchymale Zelle		Kollagen Typ I	SOX9, CBFA1
Prä-chondrozyt		N-CAM, Tenascin C (Kollagen Typ II)	SOX9 (SOX5, SOX6)
Früher Chondroblast		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein (COMP, Matrilin 1)	SOX5, SOX6, SOX9 (FGFR3, ATL2)
Säulenförmiger Chondroblast		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein, COMP, Matrilin 1	SOX5, SOX6, SOX9 FGFR3, ATL2
Prähypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein, COMP, Matrilin 1 (Kollagen Typ X)	PTH1R, IHH, CBFA1, RUNX3
Hypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ X	CBFA1, RUNX3, VEGF, (c-MAF)
Terminaler Chondrozyt		Matrix-metalloproteinase 13, Osteopontin	CBFA1, c-MAF

Abb. 4: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten (aus Caplan et al., 1994).

1.6.2 Kulturbedingungen

Webber et al. (1988) veröffentlichten Studien über die Effekte verschiedener Medien auf Fibrochondrozyten. Hierbei bewirkte die Kombination aus Ham's F-12 und fötalem Kälberserum ein schnelleres Wachstum der Zellen. Weiterhin entwickelten sie ein serumfreies Medium, das jedoch in der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen gegenüber dem serumhaltigen Medium unterlegen war.

Ibarra et al. (2000) erweiterten die Kulturmöglichkeiten durch subkutane Implantation bzw. durch die Verwendung eines Bioreaktors.

1.6.3 Wachstumsfaktoren

Im Bereich des Tissue Engineering kommt den Wachstumsfaktoren eine wichtige Bedeutung zu. Zum einen lässt sich somit die Syntheseleistung regulieren und die Proliferation erhöhen, zum anderen ist grundsätzlich eine Differenzierung der MSZ in mesenchymale Zellen möglich. In Tabelle 2 ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Wachstumsfaktoren im Bereich der Meniskusforschung aufgelistet.

<u>Wachstumsfaktor</u>	<u>Ergebnis</u>
FGF	Stimuliert die Proliferation
PDGF-AB	Mitogene Reaktion des äußeren Drittels Stimuliert die Zellbewegung und DNA-Synthese
TGF- β	Erhöht die Proteoglykansynthese
Hyaluronsäure	Verbessert die Heilung eines zylindrischen Defekts
HGF	Stimuliert die Zellbewegung und DNA-Synthese
BMP-2	Fördert die Zellbewegung und DNA-Synthese
IGF-1	Fördert die Zellbewegung
Interleukin-1	Fördert die Zellbewegung
EGF	Fördert die Zellbewegung
Hyaluronan	Stimuliert die kollagene Wiederherstellung der peripheren Zone

Tab. 2: Wachstumsfaktoren und ihre Wirkung (aus Sweigart et al., 2001).

1.6.4 Trägermaterialien

An das Trägermaterial werden viele Ansprüche gestellt. Zum einen sollte es gut verträglich und biologisch abbaubar sein und der Zelleinwanderung keinen Widerstand entgegensetzen. Zum anderen sollte es sowohl eine hohe mechanische Belastbarkeit aufweisen, als auch für Nährflüssigkeit durchdringbar sein. Entscheidend ist zudem eine ideale Resorptions-Regenerationsquote zur Wiederherstellung des Gewebe (Arnoczky et al., 1999).

Bevor ein Trägermaterial konzipiert wird, müssen folgende Faktoren beachtet werden:

- Porengröße: Der Idealwert liegt zwischen 150 und 500 μm (Sweigart et al., 2001).
- Kompressionsstärke: Der optimale Druck beträgt mindestens 150 kPa (unterer Rand der Belastung eines humanen Meniskus). Diese Belastung fördert die Umwandlung von fibrösem Gewebe in Fibrochondrozyten (van Tienen et al., 2003).
- Haltbarkeit und Abbauprofil: Das Gewebe sollte beim Abbau gleichzeitig durch neues ersetzt werden (Arnoczky et al., 1999).
- Adhäsive Eigenschaften: Diese dienen der Befestigung, z.B. durch reaktive Carboxylgruppen an der Oberfläche (van Tienen et al., 2003).

Vier natürliche Trägermaterialien kommen für die Meniskusforschung in Frage, Kollagen, Dünndarmmukosa sowie periostales und perichondrales Gewebe.

Hierbei zeigte periostales Gewebe die schlechtesten mechanischen Ergebnisse (Sweigart et al., 2001). In vivo Untersuchungen am Schaf mit perichondralem Gewebe lieferten gute Anfangsergebnisse, allerdings waren die mechanischen Eigenschaften nach 12 Monaten dem natürlichen Meniskusgewebe deutlich unterlegen (Bruns et al., 1998). Ebenso erzielte Dünndarmmukosa anfänglich gute Ergebnisse (Sweigart et al., 2001). Wegen der kurzen Studienlaufzeit von nur 12 Wochen konnte jedoch keine Aussage über das Langzeitverhalten getroffen werden. Zudem lagen keine Ergebnisse zu mechanischen Tests vor.

Eine Vielzahl synthetischer Trägermaterialien waren bereits Gegenstand diverser Studien, die jedoch zusammenfassend in ihren Eigenschaften dem natürlichen Kollagengerüst des Meniskus unterlegen waren.

Veith et al. (1983) verwendeten Karbonfasern. Trotz vielversprechender Kurzeitergebnisse war die Aussagekraft aufgrund der fehlenden biochemischen und biomechanischen Studien gering. Eine Ergebnisverbesserung wurde durch den Ersatz der Karbonfasern mit Polyurethane-poly(L-lactide) erreicht, jedoch wurden wiederum keine

biochemischen und biomechanischen Untersuchungen durchgeführt (Sweigart et al., 2001).

Weiterhin wurden Teflonnetze als Trägermaterial verwendet, was zwar die Degeneration des Gelenkknorpels verzögerte, aber nicht aufhielt (Sweigart et al., 2001). In der Gruppe der Polyurethane zeigte das poröse Polyurethan die besten Ergebnisse (de Groot et al., 1996), wobei nach 15 Wochen das Einwachsen von Gewebe beobachtet werden konnte. Leider verfügte dieses Gewebe nur über eine geringe Zugfestigkeit, was die Gefahr einer Lösung des Implantats von seiner Befestigung erhöhte. Am Ende der Studie traten jedoch analog zu den anderen Materialien Gelenkknorpeldegenerationen auf.

Ibarra et al. (2000) entwickelten ein PGA und ein PGLA, welche für einige Tage besiedelt und danach subkutan implantiert wurden. Nach einer von der Tierspezies abhängigen variablen Kultivierungszeit wurden sie in den Defekt eingebaut. Am Ende war das Gewebe reich an Proteoglykanen und hatte eine organisierte Kollagenfasermatrix.

Die mit Abstand besten Ergebnisse lieferte Kollagengewebe. Hervorzuheben waren in dieser Gruppe die Kollagen-GAG-Verbindungen (Sweigart et al., 2001). Dieses von Rindersehnen gewonnene und aufbereitete Trägermaterial ist bereits in der zweiten klinischen Phase. Die klinischen Versuche bestanden darin, die zerstörte Meniskusregion von Patienten zu entnehmen, das Ersatzgewebe in der passenden Größe einzusetzen und anzunähen. Hierbei variierte der Ersatz zwischen 35% und 85% des Gesamtmeniskus. Nach drei Jahren waren die Ergebnisse vielversprechend, es trat keine Degeneration des Gelenkknorpels auf.

Eine sich bereits in der weltweiten klinischen Anwendung befindene Alternative stellt der CMI-Meniskus aus Kollagen I-Gewebe dar. Sowohl Steadman et al. (2005) als auch Zaffagnini et al. (2007) publizierten mehrjährige Langzeitstudien mit niedrigen Patientenzahlen nach durchgeführtem Ersatz eines Meniskus mit CMI. Hierbei zeigten sich keine Anzeichen einer fortschreitenden Arthrose. In der Studiengruppe von Zaffagnini zeigten sich in der 6-8 Jahreskontrolle bei 5 von 8 Patienten keine Änderung der Implantatgröße, bei 2 eine Verminderung und bei einem konnte das CMI nicht mehr nachgewiesen werden.

1.6.5 Tiermodelle

Es gibt eine Vielzahl von Tiermodellen mit jeweils spezifischen Eigenschaften. Die Wahl des entsprechenden Tiermodells hängt von den Zielsetzungen des Versuches ab:

- mechanische Eigenschaften; Kälber oder Rinder
- Wundheilung; Hasen und bevorzugt Kaninchen
- Biochemische Untersuchungen; Hasen, Hunde, Schafe, Kühe und Schweine (Sweigart et al., 2001)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es kein ideales Tiermodell gibt und man aufgrund der Zielsetzung, der Kosten und der Größe des gewünschten Gewebes entscheiden muss.

1.7 Fragestellung

Meniskusverletzungen stellen in der heutigen Zeit eine große Herausforderungen in der Orthopädie und Unfallchirurgie dar. Aufgrund der besonderen Blutversorgung des bradytrophen Gewebes besitzt der Meniskus nur eine geringe Selbstheilungstendenz. Diese ist vornehmlich auf den Bereich der vaskularisierten Zone beschränkt. Die Teilresektion des Meniskus kann in Folge der fehlenden Ausgleichsfunktion die Inzidenz für Kniegelenkarthosen erhöhen. Trotz einer Vielzahl möglicher Therapieformen ist es noch nicht gelungen, eine auf lange Sicht erfolgreiche Behandlung zu entwickeln. Eine neue Strategie stellt die Verwendung von humanen MSZ für die Rekonstruktion von defektem oder erkranktem Meniskusgewebe dar. Erste tierexperimentelle Studien haben zukunftssträchtige Perspektiven eröffnet.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Besiedlungsfähigkeit einer Polylaktidmatrix mit MSZ untersucht werden. Als Trägersubstanz der Zellen diene ein Kollagen I-Hydrogel. Hierbei sollte zum einen die optimale Konzentration an MSZ ermittelt und zum anderen die Möglichkeit einer chondrogenen Differenzierung mit Hilfe des Wachstumsfaktors TGF- β 1 untersucht werden. Das Studiendesign wurde über 3 Wochen geplant. Sowohl eine histologische Aufarbeitung als auch RT-PCR Analysen sollten bezüglich der Ergebnisauswertung durchgeführt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rekonstruktion von Stanzdefekten innerhalb von humanen Meniskusgewebe getestet werden. Hierbei sollte zunächst die optimierten Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukte in einen definierten Stanzdefekt eines humanen Meniskus implantiert werden und die zeitliche Entwicklung histologisch beobachtet werden. In einem nächsten Schritt sollte die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukte im Meniskusstanzdefekt untersucht werden.

Als Kriterium der Besiedlungsfähigkeit sollte sowohl die Konzentration an Zellen als auch die Bildung von EZM dienen. Zur Untersuchung der chondrogenen Differenzierung sollte der Nachweis von Kollagen II und sulfatierten Proteoglykanen sowie eine histologische Aufarbeitung mit zusätzlicher Immunhistochemie durchgeführt werden.

Die Versuchsreihen dienen der Fragestellung, ob eine in vitro Rekonstruktion von humanen Meniskusstanzdefekten durch die kombinierte Verwendung von Polylaktidpolymeren, Kollagen I-Hydrogelen sowie MSZ prinzipiell möglich ist und ob sich nach 3 Wochen eine direkte Anlagerung von Polylaktidkonstrukten an Meniskusgewebe ergibt. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob eine Differenzierung von MSZ innerhalb des Meniskus-Polylaktidkonstruktes zu chondrogenen Zellen möglich ist.

Zusätzlich sollte das Ergebnis der Rekonstruktion von Meniskusdefekten Rückschlüsse für ein weiteres experimentelles Vorgehen liefern und somit die Voraussetzungen für geplante tierexperimentelle Versuchsreihen in Kaninchen schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ)

2.1.1 Isolierung und Kultivierung aus dem Knochenmark

MSZ wurden aus dem Hüftkopf von Patienten, denen eine Hüftendoprothese implantiert wurde, isoliert (Nöth et al., 2002). Spongioser Knochen wurde mit einem scharfen Löffel aus dem Hüftkopf gewonnen. 5-10 ml Gewebe wurden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Medium (DMEM/HAM's F-12, FBS, Antibiotika und L-Ascorbat-2-Phosphat) gegeben und gevortext, um die Knochenmarkzellen von den Knochen trabekeln herauszulösen, und anschließend bei 1200 Umdrehungen für 5 min zentrifugiert. Das Pellet aus Zellen und Knochenstücken wurde in 10 ml Medium aufgenommen und gevortext. Der hauptsächlich aus Fett bestehende Überstand wurde abgesaugt. Die aus dem trabekulären Knochen gelösten Zellen in der Suspension wurden mit einer 10 ml Spritze und einer 20G Nadel in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde vier mal wiederholt, bis die Zellen größtenteils aus dem Knochen gelöst waren und dieser gelblich-weiß erschien. Die gewonnenen Zellen wurden bei 1200 Umdrehungen für 5 min zu einem Pellet zentrifugiert und dieses in Medium resuspendiert. 2×10^8 Zellen wurden auf drei 150 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät, mit 20 ml Standardmedium überschichtet und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt und die adhärenen Stammzellen dreimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml Standardmedium wurden die Zellen weiter kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage.

Zur Vermehrung der Zellen wurden diese kurz vor Erreichen der Konfluenz mit Trypsin abgelöst. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 7 ml 0,05% Trypsin/EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde mit 14 ml Standardmedium inaktiviert und die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1600 U/min für 5 min wurde das gewonnene Pellet in Standardmedium resuspendiert und die Zellen in 150 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät. Es erfolgte eine Splittung der Zellen im Verhältnis 1:3.

2.1.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Nach Resuspension des Pellets wurden 50 µl entnommen, mit der gleichen Menge an Trypanblau vermischt und 1-5 Minuten inkubiert. 10 µl wurden in eine Kammer der Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop vier Großquadrate ausgezählt. Die Anzahl von Zellen errechnete sich laut Hersteller aus der Formel: Gesamtzellzahl = Zellzahl pro Großquadrat/4 x 10⁴ x Mischverhältnis (1:1 → 2) x ml Resuspension

2.2 Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukt

2.2.1 Polyaktidpolymer

Ein dreidimensionales Polylaktid-Scaffold der Firma BD Biosciences (Katalog Nr. 354614) wurde als Grundstruktur für das herzustellende Konstrukt verwendet. Dieses Polymer besteht aus D,D-L,L-Polylaktidsäure und kann etwa 30 µl Flüssigkeit aufnehmen. Es hat eine Porengröße zwischen 100 und 200 µm, ein offenes Volumen von 75% und einen Durchmesser von 4,2 bis 5,2 mm.

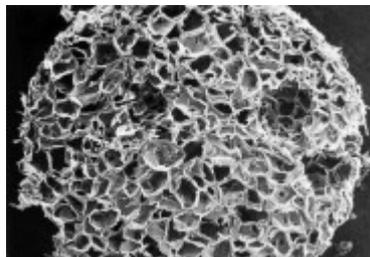


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Darstellung des porösen Polylaktidpolymers (aus BD Biosciences, www.bdbiosciences.com/image_library/Faceted_OPLA3.jpg)

Die humanen Menisci wurden aus dem Kniegelenk von Patienten mit Knieendoprothesenersatz entnommen, grob gereinigt und in Standardmedium gelagert. Die Menisci wurden innerhalb einer Woche verwendet, um ein intaktes Gewebe sicherzustellen.

2.2.2 Herstellung des Kollagen I-Hydrogels

Die Komponenten für die Herstellung des Kollagen I-Hydrogels stellte freundlicherweise die Firma Arthro Kinetics AG in Esslingen zur Verfügung. Es wurden zwei Lösungen verwendet:

Kollagen I-Hydrogel

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

Gelneutralisationslösung

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

2.2.3 Herstellung der Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukte

Kollagen I-Hydrogel-Lösung und Gelneutralisationslösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die gewünschte Zellzahl darin resuspendiert. Ein Polymer-Scaffold hat eine Aufnahmekapazität von ca. 30 μl Flüssigkeit. Dies wurde in Vorversuchen an Kollagen I-Hydrogelen getestet und bestätigt. Diese Menge wurde mit Hilfe einer Pipette auf das Polymer aufgebracht und für eine Stunde zum Gelieren des Kollagenhydrogels in den Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO_2 gegeben. Zum Abschluß erfolgt die Überdeckung des Konstruktes mit dem jeweiligen Medium.



Abb. 6: Dargestellt ist die Herstellung des Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstruktes. Aufbringen des flüssigen Kollagen I-Hydrogels mit MSZ auf das Polymer mit Hilfe einer Pipette.

2.3 Verteilung des Kollagen I-Hydrogels im Polylaktidpolymer

Kollagen I-Hydrogel-Lösung und Gelneutralisationslösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit Hilfe einer Pipette auf das Polymer aufgetragen. Es erfolgte die histologische Aufarbeitung mit einer HE-Färbung einen Tag nach abgeschlossener Gelierung.

2.4 Optimale Zellkonzentration im Polylaktidpolymer

Es wurden hinsichtlich der Besiedelung des Polylaktidpolymers verschiedene Konzentrationen getestet. Die Zellbesiedelung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Es wurden $8,3 \times 10^6$, $1,25 \times 10^7$ und $1,7 \times 10^7$ MSZ pro ml verwendet und für drei Tage in Standardmedium kultiviert.

2.5 Chondrogene Differenzierung der Polylaktidkonstrukte

Es wurden gemäß Abschnitt 2.2.3 Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukte mit je $1,7 \times 10^4$ MSZ pro μl hergestellt und in eine Differenzierungsgruppe und eine Kontrollgruppe eingeteilt. In der ersten Gruppe erfolgte die Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF- β 1, in der Kontrolle in Standardmedium für jeweils 21 Tage. Es erfolgte sowohl eine histologische

Aufarbeitung mit Alzian Blau- und Kollagen II-Färbung, als auch eine RT-PCR Auswertung.

2.5.1 RT-PCR Analyse

Zur Bestimmung der Expression bestimmter chondrogener Marker durch die Zellen wurde eine DNA-Analyse durchgeführt. Die Polylaktidkonstrukte wurden zunächst mit PBS gewaschen, mechanisch zerkleinert und in 500 µl RLT-Puffer und 5 µl Mercaptoethanol gelöst und bei -80°C eingefroren.

2.5.2 RNA-Isolierung

Es erfolgte eine RNA-Isolierung mit dem NucleoSpin® RNA II Kit. Das Lysat wurde filtriert und auf eine Filter Unit in einem Eppendorfgefäß platziert. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 11000 U/min. Die Filter Unit wurde verworfen, 350 µl 70%-igen Ethanol zugeben und gevortext. Die Säule wurde entnommen, das Lysat aufgegeben und für 30 s bei 8000 U/min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß platziert.

Zum Entsalzen und Trocknen der Silica-Membran wurden 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) zugegeben und 1 min bei 11000 U/min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Inhalt eines Röhrchens in 540 µl PCR-Wasser gelöst, in 50 µl portioniert und mit 10 µl rekonstituierter DNase I zu 90 µl DNase-Reaktionspuffer gegeben und gemischt. 95 µl der DNase-Reaktionsmischung wurden mittig auf die Silica-Membran gegeben. Es folgte eine Inkubation bei RT für 15 min. Zum Waschen und Trocknen der Silica-Membran wurden zunächst 200 µl Puffer RA2 (inaktiviert DNase) hinzugefügt und für 30 s bei 8.000 U/min zentrifugiert. Die erhaltene Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gegeben und 600 µl Puffer RA3 auf die Säule pipetiert. Wiederum wurde eine Zentrifugation für 30 s bei 8000 U/min durchgeführt. In einem dritten Waschschrift wurden 250 µl Puffer RA3 verwendet und 2 min bei 11000 U/min zentrifugiert. Die Säule wurde in Nuklease-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Es folgte die Elution der RNA, dabei wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und für 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl RNA-Probe zu 48 µl 10 mM Tris-Base (= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (pH-Wert 7,2-7,5) gegeben und als Nullprobe 50 µl 10 mM Tris-Base (pH-Wert 7,2-7,5) verwendet. Zum Ausmessen wurden 50 µl Gesamtvolumen in eine Uvette (Küvette von Eppendorf) überführt und am Eppendorf-Biophotometer gemessen.

2.5.3 cDNA-Synthese

Es wurde die BioScript Reverse Transkriptase (Bioline) verwendet. Hierbei wurden zunächst die RNA-Proben auf Eis aufgetaut, das benötigte Volumen an RNA-Suspension ausgerechnet, autoklaviertes HPLC-H₂O in autoklavierte 1,5ml-Reaktionsgefäße vorgelegt, so dass sich zusammen mit dem Volumen der RNA-Suspension ein Endvolumen von 11 µl ergab. Das benötigte Volumen der RNA-Suspension wurde dazupipettiert und 1 µg/µl Random Hexamere je Probe hinzugefügt. Es folgte nun 5 min bei 70°C im Heizblock und im Anschluss 5 min auf Eis. In einem weiteren Schritt wurde kurz anzentrifugiert und ein Master Mix aus 4 µl 5fach-Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM dNTPs, 2,75 µl HPLC-H₂O und 0,25 µl 200 U/µl BioScript Reverse Transkriptase hinzugegeben und kurz gevortext. Nun folgten 10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C sowie 10 min bei 70°C. Dann wurden 30 µl HPLC-H₂O dazugegeben, so dass das endgültige Endvolumen 50 µl betrug.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.5.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion diente zur Vervielfältigung bestimmter Teile des Genoms mit Hilfe spezifischer Primersequenzen (Tabelle 3). In der Versuchsreihe wurden typische chondrogene Marker, wie Kollagen II und Aggrekan verwendet.

Zunächst wurde der Ansatz hergestellt. Hierbei wurden 21,9 µl H₂O, 3 µl 10 x NH₄ Puffer, 1 µl MgCl₂ 50 mM, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Primer forward (5 pmol/µl), 1 µl Primer revers (5 pmol/µl), 0,1 µl Taq-Polymerase Bioline (5000 U/ml) und 1 µl cDNA bzw. für die PCR-Negativkontrolle 1 µl HPLC-H₂O

hinzugegeben. Das Gemisch wurde in PCR-Tubes pipettiert und der Thermocycler gestartet. Das Programm sah wie folgt aus:

Zunächst wurde für 3 min auf 94°C erhitzt, danach je nach Programm unterschiedlich oft der Zyklus mit 94°C für 30 sec, Annealing Temperatur für 1 min und 72°C für ebenfalls 1 min durchgeführt. Nach Abschluss der Zyklen erfolgten 5 min bei 72°C und abschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Kol II	Kollagen II	
	Sense	TTT CCCAGG TCA AGA TGG TC
	Antisense	CTT CAG CAC CTG TCT CAC CA
	Annealing-Temp.	58°C
	Zyklenzahl	32
	Basenpaare	374
Aggrekan	Aggrekan	
	Sense	GCC TTG AGC AGT TCA CCT TC
	Antisense	CTC TTC TAC GGG GAC AGC AG
	Annealing-Temp.	54°C
	Zyklenzahl	28
	Basenpaare	392

Tab. 3: Übersicht der Primer zur Verifizierung der chondrogenen Markergene.

2.5.5 Gelelektrophorese

Nach Erhalt der PCR-Produkte erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese. Zur Herstellung wurden 1,5 g DNA/RNA Agarosegel-Pulver in einem Erlenmeyerkolben zusammen mit 150 ml 0,5% TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, 7,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in eine entsprechende Gelelektrophoresekammer (mit Kamm) gegossen und ausgehärtet.

9,9 µl PCR-Produkt wurden mit 1,1 µl 10 x DNA-Ladungspuffer gemischt und in die durch den Kamm entstandenen Taschen gegeben. In die erste Tasche

wurde jeweils ein 100bp DNA-Marker zur Bestimmung der Größe der einzelnen DNA-Fragmente eingefüllt und in der Gelelektrophoresekammer bei 140 V für 45 min nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die Photodokumentation (BioCaptMW; Version 099.03s for Windows)

2.6 Defektheilung im Meniskus mit Polylaktidkonstrukten

2.6.1 Im zeitlichen Verlauf

Einem humanen Meniskus (Abb. 7A), gewonnen nach einer Knie-TEP, wurde mittig (Abb. 7B und C) ein 4 mm großer Defekt mit einer sterilisierten handelsüblichen Stanze zugefügt und ein vorher vorbereitete Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukte mit $1,7 \times 10^7$ MSZ pro ml, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, eingesetzt (Abb. 7D). Aufgrund des press-fit Verfahrens war eine gute Adhäsion auch ohne Nähte zu erreichen. Hierbei wurde das minimal größere Polylaktidpolymer in den Stanzdefekt mit Hilfe einer Pinzette implantiert. Es erfolgte eine histologische Auswertung am ersten, dritten, zehnten sowie am 21. Tag der Kultivierung.

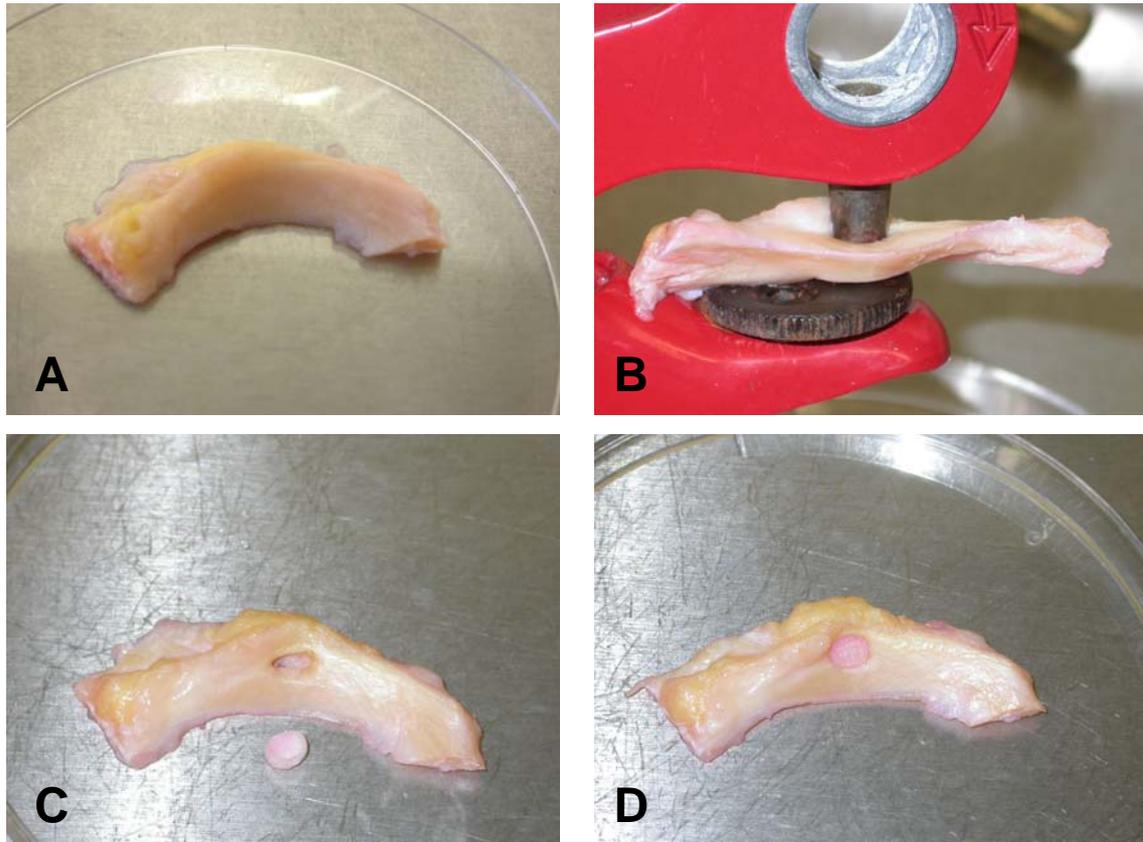


Abb. 7 A-D: Dargestellt ist die Meniskusstanzdefektsetzung mit Implantation des Poly(lactid)konstruktes. A: Nativer Meniskus. B: Stanzen eines 4 mm Loches in einen humanen Meniskus. C: Die Stanzdefektsetzung erfolgte im mittleren bis äußeren Drittel des Meniskus. Vorbereitetes Poly(lactid)-Polymer mit Kollagen I-Hydrogel und MSZ. D: Meniskus nach Einsetzen des Poly(lactid)konstruktes.

2.6.2 Chondrogene Differenzierung

Die Herstellung des Poly(lactid)-Kollagen I-Hydrogelkonstruktes, sowie die Einbettung in den Meniskusstanzdefekt mit der press-fit Methode, erfolgte wie unter Abschnitt 2.6 beschrieben. Die so hergestellten Menisci wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

Differenzierungsgruppe

Der Meniskus mit zellbeladenem Poly(lactid)konstrukt wurde für 3 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF- β 1 Zusatz kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

Kontrollgruppe

Der Meniskus mit zellbeladenem Polylaktidkonstrukt wurde für 3 Wochen in Standardmedium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.7 Histologie

2.7.1 Konservierungs- und Schneideverfahren

Kryokonservierung

Das jeweilige Gewebe wurde mit Tissue-Tek Freezing-Medium bedeckt und zum Einfrieren das Gefäß mit einer Pinzette für 1 min in flüssigen Stickstoff gehalten und anschließend bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Am Kryostat wurden von dem eingefrorenen Konstrukt $9\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Nach zweistündiger Trocknung wurden die Schnitte mit eiskaltem Aceton 10 Minuten fixiert.

Vor dem Färbevorgang erfolgte für 10 Minuten eine Waschung mit Wasser, um das Tissue Tek Freezing-Medium zu entfernen.

Paraffinkonservierung

Das Gewebe wurde zunächst mit PBS gewaschen und für zwei Stunden in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde für 2 Stunden in Leitungswasser ausgewaschen und danach für jeweils eine Stunde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 95% und 100% Ethanol) entwässert. Im Anschluss erfolgt eine 30 minütige Inkubation in einem Ethanol/Amyloacetat-Gemisch, zunächst bei Raumtemperatur und nach Wechsel der Lösung bei $56-60^{\circ}\text{C}$ im Heizblock. Es folgte eine zweimalige Inkubation für 30 min in Amyloacetat bei 60°C im Heizblock.

Das konservierte Gewebe wurde in eine Einbettkassette überführt und zweimal über Nacht in Paraffin eingelegt. Im Anschluss wurden die Konstrukte eingeblockt, bei -20°C für 2 Stunden gehärtet und danach $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte für 60 min in den Wärmeschrank bei 60°C gestellt und zweimal für 8 min Xylol (oder Roticlear) gewaschen.

Anschließend folgte eine Rückführung in destilliertes Wasser in einer absteigenden Alkoholreihe mit zweimal 2 min 95% Ethanol, 5 min bei 70% Ethanol und 5 min bei 50% Ethanol.

2.7.2 Histologische Färbungen

Hämatoxylin/Eosin

Diese Übersichtsfärbung dient zur Darstellung aller basophilen Zell- und Gewebestrukturen (Chromatin der Zellkerne, einige Cytoplasmabestandteile) mit blauer sowie der acidophile Bestandteile mit roter Anfärbung.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Färben in Hämatoxylinlösung 10 min
- H₂O dest., Färbelösung entfernen spülen
- Differenzieren in 0,25% HCl/50% Ethanol 3 s
- H₂O dest. spülen
- Bläuen in Leitungswasser 10 min
- Färben in 1% Eosinlösung 1-2 min
- H₂O dest., Färbelösung entfernen spülen
- Differenzieren in 70% Ethanol 3 s
- Entwässern in 95% Ethanol 3 s
- 100% Isopropanol 2 x 5 min
- Xylol 2 x 5 min

Alzian Blau

Die Färbung dient zum Nachweis von negativ geladenen sulfatierten Proteoglykanen, ein Hinweis auf eine stattgefundene chondrogene Differenzierung.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- 3% Essigsäure 3 min
- Alcian Blau 8GX (pH-Wert 1,0) 30 min
- H₂O dest. spülen
- Gegenfärbung mit Kernechtrot 2 min

- H₂O dest. spülen
- Differenzieren in 70% Ethanol 3 s
- Entwässern in 95% Ethanol 3 s
- 100% Isopropanol 2 x 5 min
- Xylol 2 x 5 min

2.7.3 Immunhistochemische Färbungen

Kollagen II

Der verwendete Kollagen II Antikörper bindet an die $\alpha 1(\text{II})$ und $\alpha 3(\text{XI})$ -Ketten mit identischer Primärstruktur im Menschen, Huhn, Maus und Salamander. Die verwendete Konzentration entsprach 670 ng/ml.

Die Färbung diente zum Nachweis von chondrogen differenzierten MSZ und wurde wie folgt durchgeführt:

- Inkubation in Waschpuffer 15 min
- Mit DakoPen Schnitte einkreisen
- Verdau mit 1 mg/ml Pepsin in 1 M Tris HCl, pH-Wert 2,0 bei RT 15 min
- Waschen mit Waschpuffer 3 x
- Blockieren unspez. Bindungsstellen mit 100 μl Blockierungslösung (2% BSA, 5% normal horse serum in 1xTBS) bei RT 20 min
- Überschichten der Zellen mit 100 μl primären Antikörper in entsprechender Verdünnung (1:300), Inkubation in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei ca. 4°C über Nacht
- Waschen mit Waschpuffer 3 x
- Überschichten der Zellen mit 1-3 Tropfen Link Inkubation: in einer feuchten Kammer bei RT 15 min
- Waschen mit Waschpuffer 3 x
- Überschichten der Zellen mit 1-3 Tropfen Label Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT 15 min

- Waschen mit Waschpuffer 3 x
- Zugabe des Chromogen Fast Red 2-5 min
- Waschen mit H₂O dest. 3 x
- in H₂O dest. belassen 1 min
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin 9 min
- Waschen mit H₂O dest. 3 x
- Bläuen in Leitungswasser 10 min
- Eindecken mit wässrigem Eindeckmittel

2.8 Verwendete Lösungen und Ansätze

2.8.1 Kultivierungsmedien

Stammzellmedien

500 ml	DMEM/HAM's F-12
50 ml	FBS
5 ml	Antibiotika (50 IU Penicillin/ml, 50 ug Streptomycin/ml)
550 µl	L-Ascorbat-2-Phosphat

Webber et al. (1988) zeigten, dass sowohl ein Zusatz von HAM'S F-12 als auch der Zusatz von FBS zu einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen führte.

Chondrogenes Differenzierungsmedium (TGF-β1)

500 ml	DMEM high Glucose (4,5 g/l)
5 ml	IST plus 1
5 ml	Antibiotika (50 IU Penicillin/ml, 50 ug Streptomycin/ml)
550 µl	L-Ascorbat-2-Phosphat
500 µl	Pyruvat
500 µl	Prolin
50 µl	Dexamethason
500 µl	TGF-β1 (wurde erst bei Verwendung des Mediums in der Konzentration von 10 ng/ml hinzugegeben)

2.8.2 Färbelösungen

Alzian Blau

- Alzian Blau 0,1 g Alzian Blau 8 GX in 97 ml destilliertem Wasser lösen
und 3 ml Eisessig zufügen
- Kernechtrot 0,1 g Kernechtrot in 100 ml 5% Aluminiumsulfatlösung
heiß lösen und nach Erkalten filtrieren

Hämatotoxylin/Eosin nach Mayer

- Hämato- 0,1 g Hämatotoxylin in 1000 ml destilliertem H₂O lösen
toxylin 0,2 g NaJO₃
50 g reines Kalium (Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat)
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure
- Eosin 0,1 g Eosin in 100 ml destilliertem Wasser lösen

2.8.3 Pufferlösungen

TBE-Puffer für Gelelektrophorese

- 108 g Trishydroxymethylaminomethan
55 g Borsäure

Waschpuffer (0,05 M TBS pH-Wert 7,6)

- 60,6 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
87,6 g NaCl
900 ml H₂O bidestilliert
1:10-Verdünnung 10xTBS mit H₂O
bidestilliert

DNA Ladungspuffer

3 ml	Glycerol (30%)
2 ml	EDTA
1 ml	SDS (0,1 %)
5 mg	Bromphenolblau (0,25%)
5 mg	Xylene Cyanol (0,25%)
4 ml	H ₂ O dest.

Chromogen Fast Red

750 µl	AP Substrate Buffer
30 µl	Chromogen Red 1
30 µl	Chromogen Red 2
30 µl	Chromogen Red 3

2.8.4 Antikörper-Detektionssystem

Kollagen II: monoklonaler Maus IgG₁, Chemicon, Best.Nr. MAB8887, 6B3

2.9 Chemikalien und Geräte**2.9.1 Chemikalien**

Aceton (AppliChem, Darmstadt, E4913)

Agarose (GTQ) (Roth, Karlsruhe, 5352.4)

Aluminiumsulfat (Merck, Darmstadt)

Alzian Blau (Sigma Steinheim, A 3157)

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

Aqua bidest. (Biochrom, Berlin, L 182-50)

L-Ascorbat-2-phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim, A-8960)

Bovines Serum Albumin (BSA 0,5%) (Amersham, Freiburg, RPN412)

Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim, B-5525)

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

DMEM high Glucose (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

DNA Leiter Plus 100 bp (PeQLab, Erlangen, 252020)

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

EDTA (Fluka Chemie, Buchs, 03700)
Entellan (Merck, Darmstadt, 1.07961.0100)
Eosin (Merck, Darmstadt, 15935)
Essigsäure (Merck, Darmstadt)
Ethanol (Merck, Darmstadt, 1.00983.1000)
Ethidiumbromid (10 ng/ml) (GIBCOBRL, Darmstadt, 15585-011)
Glycerol (Merck, Darmstadt, 1.04093.1000)
Foetal Bovine Serum (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, 10270-106)
Formalin (AppliChem, Darmstadt, A0823.2500)
Hämatoxylin-Lösung (Merck, Darmstadt, 4302)
HPLC-Wasser (Carl Roth, Karlsruhe, A511.2)
Isopropanol (=2-Propanol) (Carl Roth, Karlsruhe, 6752.1)
Kernechtrot (Merck, Darmstadt)
Kollagenase XI (Sigma-Aldrich, Steinheim, C9407)
2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, 1.15433)
M-MLV RT 5x Buffer (Promega, Madison, USA, M531A)
NaCl (Merck, Darmstadt, 1.06404.1000)
Natronlauge-Maßlösung (1M) (AppliChem, Darmstadt, A 1432.1000)
Oligo(dt)Primer (Promega, Madison, USA, C1101)
PBS (Phosphat Buffer Saline) DULBECCO pH7 (Biochrom, Berlin, 498E)
PCR-Puffer (10x Konzentrat) (Amersham, Freiburg, 225285)
Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA Laboratories, Pasching, Austria, P11-010)
Prolin (Merck, Darmstadt, 8816019)
Pyruvat (Sigma Steinheim, S-8636)
Reverse Transkriptase (M-MLV RT Rnase, Promega, Mannheim, M 368C)
RNase freies A.d. (QUIAGEN, Maryland, USA, 1018017)
RNeasy Mini Kit (QUIAGEN, Maryland, USA, 74106)
Salzsäure-Maßlösung (1M) (AppliChem, Darmstadt, A 1434.1000)
SDS ultra pure (Carl Roth, Karlsruhe, 2326.1)
Taq DNA Polymerase (Cloned for PCR, 5 U/ µl) (Amersham, Freiburg, 224472)
TGF-β1 (Promocell, Heidelberg, 10 ng/ml, C-63505)
Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Holland,4583)

TRIS (hydroxymethyl) –aminomethan (Merck, Darmstadt, 1.08382.1000)

Trypanblau (0,4%) (Sigma, Steinheim T-8151)

Trypsin/EDTA (0,5g Trypsin/l, 0,2g EDTA/l) (PAA Linz, L11-004)

Xylol (Merck, Darmstadt, 1.08685.2500)

Xylene Cyanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, X-4126)

2.9.2 Materialien und Geräte

Abzug 1500 (Waldner, Wangen)

Axioskop (Zeiss, Jena)

Bio Chem-Vacuum Center, BCV 21 (Vacuumbrand, Wertheim)

Biophotometer (6131) (Eppendorf, Hamburg)

Brutschrank BB 5060 (Heraeus, Hanau, 37°C, 95% O₂, 5% CO₂)

Dampfsterilisator Varioklav VI 400EP (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)

Deckgläser (Hartenstein, Würzburg)

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

Erlenmeyerkolben (Schott, Mainz)

Färbeküvetten aus Glas (Schott, Mainz)

Feuchte Kammer: Metallkiste mit Deckel, ausgelegt mit nassen Tüchern

Gefrierschrank (Bosch, Albstadt)

Gel-Elektrophoresekammer-MIDI (Roth, Karlsruhe)

Glasküvette (5 ml, v-vials) (Wheaton, USA)

Heizblock (Promega, Mannheim)

Inkubator für Zell- und Gewebekulturen BB6060 (Heraeus, Hanau)

Kühl-Gefrier-Kombination economy (Bosch, Albstadt)

Laborbrenner (Susbeck, München)

Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena)

Magnetrührer mit Heizung M32 (Hartenstein, Würzburg)

Mikrotom-Kryostat HM 500 OM (Microm, Wallendorf)

Mikrowelle 600 W (Panasonic, Deutschland)

Multicycler PTC 200, (Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf)

Nadel Sterican 20G (Braun, Wertheim)

Objektträger (Objektträger Super Frost) (Menzel, Braunschweig)

Pasteurpipetten (Hartenstein, Würzburg)
PCR-Cycler (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Multi Cycler, Biozym)
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml) (Hartenstein, Würzburg)
PCR Tubes und Deckel (Hartenstein, Würzburg)
Petrischalen (Biozym, Hessisch Oldenburg)
Pipettierhilfe (Accujet) (Braun, Melsungen)
Pipettierspitzen Plastibrand (Laug & Scheller)
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
Schlittenmikrotom (Leitz, Oberkochen)
Sicherheitswerkbank Klasse II (HS 15, Heraeus, Hanau)
Trockenschrank T12 (Kendro – Thermo Electron, Langenselbold)
Vortex-Genie 2 G560 (Scientific Industries, Karlsruhe)
Waage Kern 770 (Kern, Mannheim)
Wasserbad 37°C (GFL, Burgwedel)
Zellkulturflaschen 150 cm² (TPP AG, Trasdingen, Schweiz)
Zentrifugen Biofuge pico/Laborfuge 400R (Heraeus, Hanau)
Zentrifugenröhrchen 50 ml (Sarstedt, Nürnbergrecht)
Zellzählkammer (Neubauer) (Marienfeld, Lauda-Königshofen)

3 Ergebnisse

3.1 Natives Meniskusgewebe

Die Paraffinschnitte des Meniskus zeigten deutlich die besonderen histologischen Merkmale des Gewebes. Charakteristisch waren sowohl radiäre als auch ungeordnete Kollagenfasern in der HE- (Abb. 6A) sowie in der Alzian Blau-Färbung (Abb. 6C). Das dichte Netz der Kollagenfasern umfasste die einzelnen Fibrochondrozyten (Abb. 6B und D). Die Alzian Blau-Färbung zeigte vereinzelte kleine positive Areale einer sulfatierten proteoglykanreichen EZM (Abb 6 D).

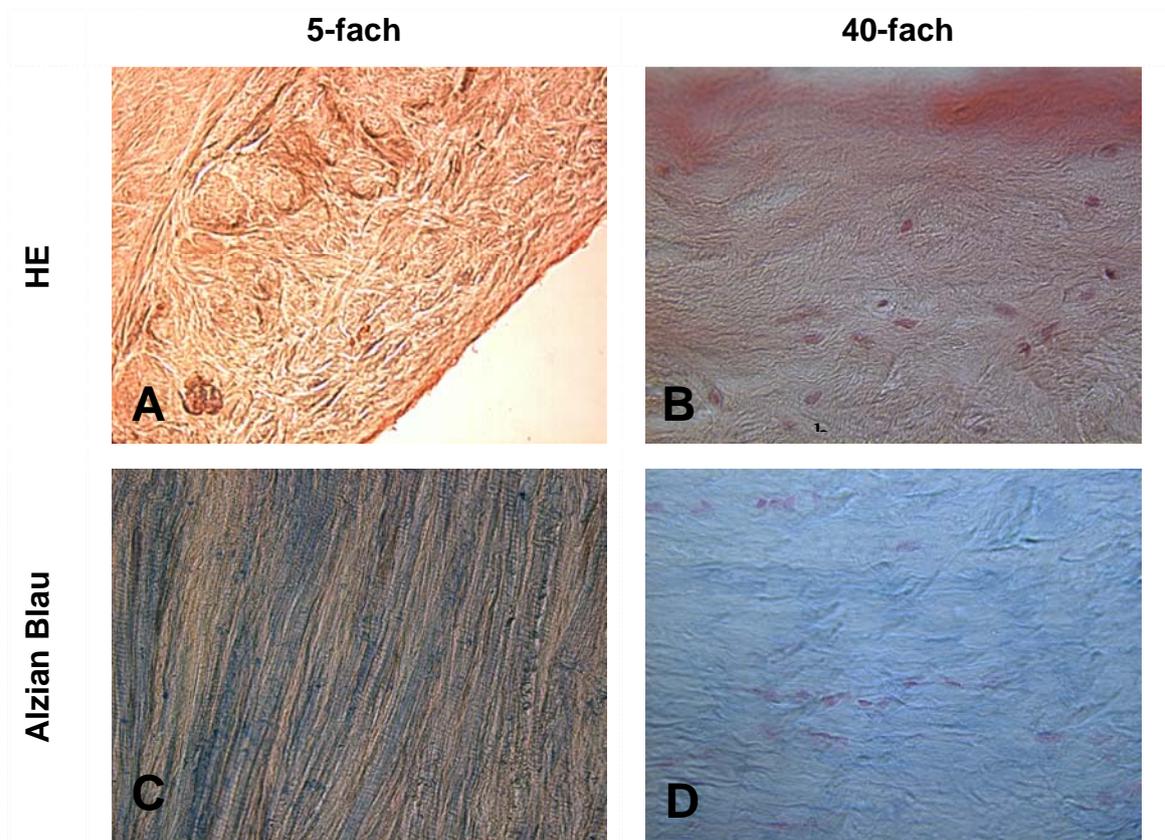


Abb. 6A-D: Dargestellt sind Paraffinschnitte von nativem Meniskusgewebe in HE- und Alzian Blau-Färbung. A und C: Übersichtsaufnahmen der Kollagenfasern. B und D: Detailbild mit Darstellung von Fibrochondrozyten mit umgebender EZM.

3.2 Verteilung des Kollagen I-Hydrogels im Polylaktidpolymer

In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich eine gute und homogene Auskleidung des Polylaktidpolymer mit dem Kollagen I-Hydrogel (Abb. 7A). In den histologischen Schnitten war nur das Kollagen I-Hydrogel sichtbar, da sich das Polylaktidpolymer während des Färbeprozesses in Alkohol aufgelöst hatte. Die 5-fache Vergrößerung zeigt die homogene Verteilung des Kollagen I-Hydrogels entsprechend der Strukturen der Trägersubstanz mit Kollagenverdichtungen (Abb. 7A).

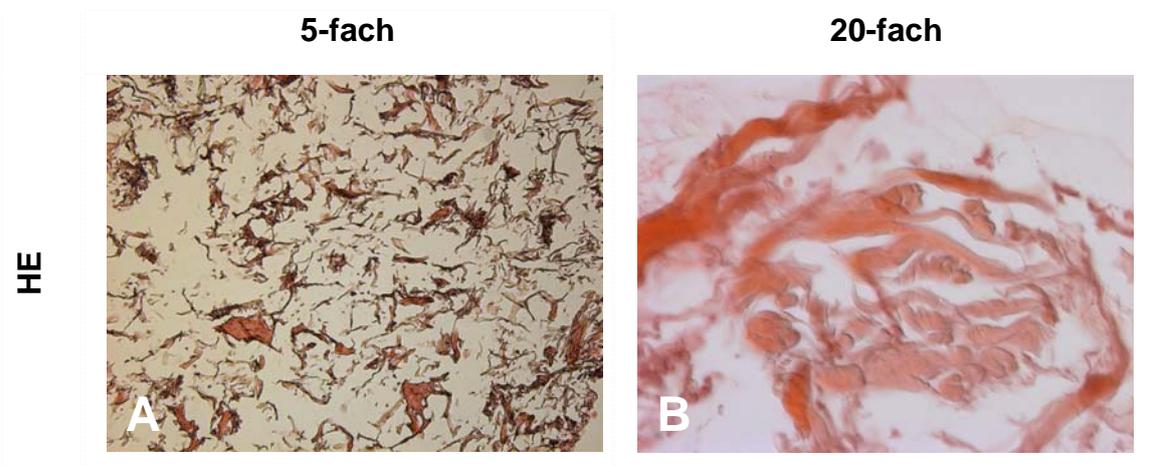


Abb. 7A und B: Dargestellt sind HE-Färbungen eines Polylaktidpolymers mit Kollagen I-Hydrogel nach 3-tägiger Kultivierung im Standardmedium. A: Übersichtsbild mit Kollagen I-Hydrogel-Netz. B: Vergrößerung einer Kollagenanreicherung innerhalb einer Aussparung des Polylaktidpolymers.

3.3 Optimale Zellkonzentration im Polylaktidpolymer

Beginnend mit einer Zellzahl $8,3 \times 10^6$ MSZ pro ml und einer kontinuierlichen Steigerungen um $4,2 \times 10^6$ MSZ wurde nach erfolgreicher Ausfüllung der Polylaktidträgermatrix mit nativem Kollagen I-Hydrogel die optimale Zellkonzentration für die Besiedelung ermittelt.

Mit steigender Zellzahl konnte eine kontinuierliche Verbesserung der Besiedelung erzielt werden. Abb. 8A und B zeigen die Ausfüllung des Polylaktidkonstruktes mit $8,3 \times 10^6$ Zellen pro ml. Hierbei war nur eine spärliche Besiedelung der Randbereiche und der Mitte zu beobachten. In der 20-fachen Vergrößerung zeigten sich die Kollagenfasern des Kollagen I-Hydrogels mit vereinzelt Zellen. Eine deutliche Steigerung war bei $3,75 \times 10^6$ MSZ pro Polymer sichtbar, mit dichter Besiedelung am Rand und mit beginnender Besiedelung der tieferen Schichten (Abb. 8C und D).

Eine umfassende Besiedelung sowohl des Rand- als auch des Mittelbereiches wurde bei $1,7 \times 10^7$ MSZ pro ml (Abb. 8E und F) beobachtet. Hierbei zeigte sich ein dichtes Netz an MSZ im Randbereich mit sichtbaren Zellen im Zentrum. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl war aufgrund einer Konsistenzzunahme der im Gel resuspendierten Zellen mit folgender Minderung der Aufnahme- und Verteilungsfähigkeit des Polylaktidkonstruktes nicht möglich.

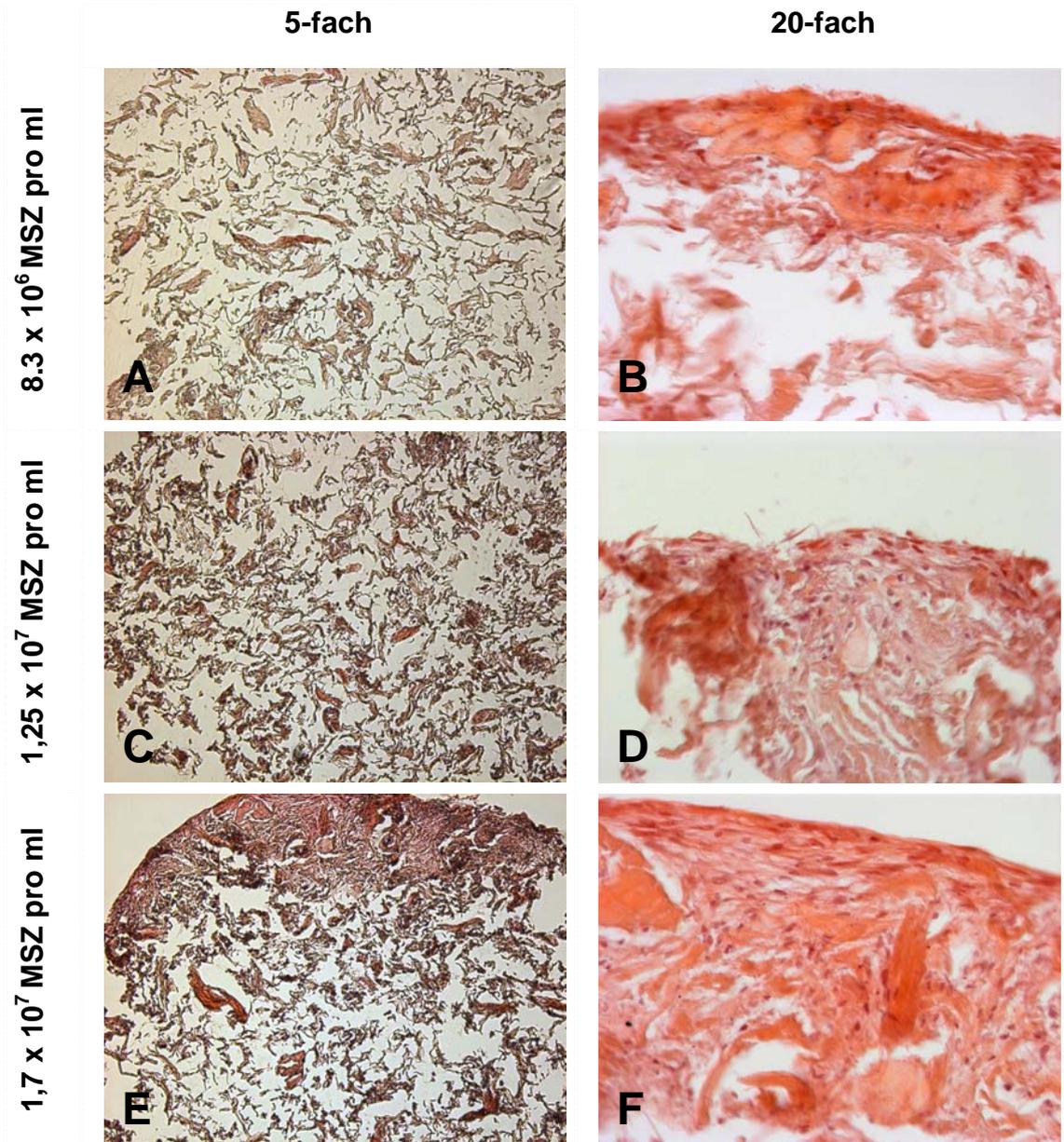


Abb. 8A-F: Dargestellt sind HE-Färbung der Polylaktidkonstrukte mit zunehmender MSZ Konzentration. A, C und E: Übersichtsaufnahmen der Rand und Zentralregion der Konstrukte. B, D und F: Vergrößerungen der Randbereiche der Polylaktidkonstrukte.

3.4 Chondrogene Differenzierung der Polylaktidkonstrukte

3.4.1 Histologie und Immunhistochemie

Nach Bestimmung der Zellzahl von $1,7 \times 10^7$ MSZ pro ml wurden Polylaktidkonstrukte für 3 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium mit TGF- β 1 Zusatz sowie Kontrollen in Standardmedium kultiviert (Abb. 9).

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine nur sehr geringe Zelldichte mit deutlich geringerer Matrixbildung im Kollagen I-Hydrogel (Abb. 9A und B). Die Zellen differenzierten sich nicht zu Chondrozyten und exprimierten kein Kollagen II (Abb. 9A und B). Während der Histologie fiel deutlich eine geringere Festigkeit der Konstrukte im Vergleich zur Differenzierungsgruppe auf.

Im Gegensatz dazu war in der TGF- β 1 behandelten Gruppe (Abb. 9C-F) eine Besiedelung mit MSZ über weite Bereiche des Polylaktidkonstruktes sichtbar. Eine chondrogene Differenzierung mit knorpelähnlichen Zellen und einer EZM mit Kollagen II Deposition waren in den Histologien der chondrogenen Differenzierung im Gegensatz zur Kontrollgruppe erkennbar (Abb. 9). Es zeigte sich in der Alzian Blau-Färbung eine Anfärbung der EZM aufgrund der hohen Konzentration an sulfatierten Proteoglykane, wie sie typischer Weise im Knorpelgewebe vorkommen (Abb. 9 C und E). Die Zellen der TGF- β 1 Gruppe waren von EZM umschlossen. Vergleichbar zu der Histologie von Knorpelgewebe bildeten sich Vorhöfe um die Zellen aus (Abb. 9 E). Dies zeigte sich auch in der Immunhistologie mit Nachweis von Kollagen II (Abb. 9 F). Im Vergleich dazu zeigte die Kontrollgruppe nur eine sehr leichte Blaufärbung, die auf das Kollagen I-Hydrogelkonstrukt zurückzuführen war (Abb. 9A).

Die Anfärbung der Kollagen II-Matrix in der Immunhistologie zeigte eine deutliche Anfärbung in der TGF- β 1 Gruppe (Abb. 9 D und F). Hierbei zeigten sich Zellen, die durch eine flächendeckende EZM-Produktion mit Kollagen II umschlossen waren. In der Kontrollgruppe konnte keine Kollagen II Produktion histologisch nachgewiesen werden (Abb. 9 B).

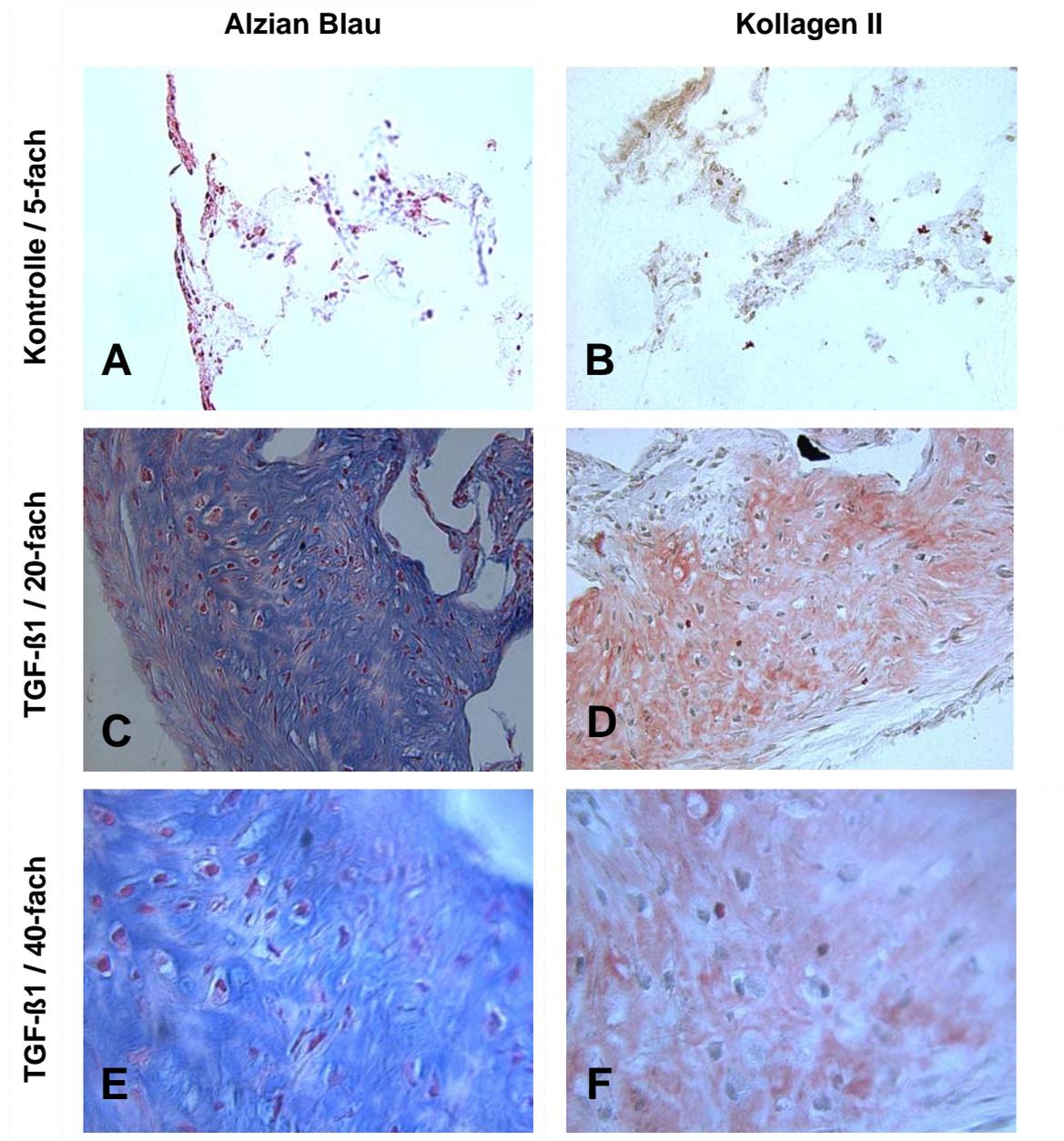


Abb. 9A-F: Dargestellt sind Alzian Blau- und Kollagen II-Färbungen von Polylaktidkonstrukten. A und B: 3-wöchige Kultivierung in Standardmedium mit nur geringer EZM-Bildung und verminderter Zellzahl. C-F: Kultivierung in Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF-β1 Zusatz mit erhöhter Zellzahl und dichter EZM. Deutliche Anfärbung mit Alzian Blau und Kollagen II.

3.4.2 RT-PCR Analysen

In den PCR Analysen bestätigten sich die histologischen Ergebnisse. Die chondrogene Differenzierung nach 3-wöchiger Kultivierung mit Zusatz von 10 ng/ml TGF- β 1 zeigte eine deutliche Bande der chondrogenen Markern, wie z.B. Aggrekan und Kollagen II. Der direkte Vergleich der Kontrollgruppe in Standardmedium bei ansonsten identischen Kultivierungsbedingungen zeigte bei beiden keine Anreicherung (Abb. 10).

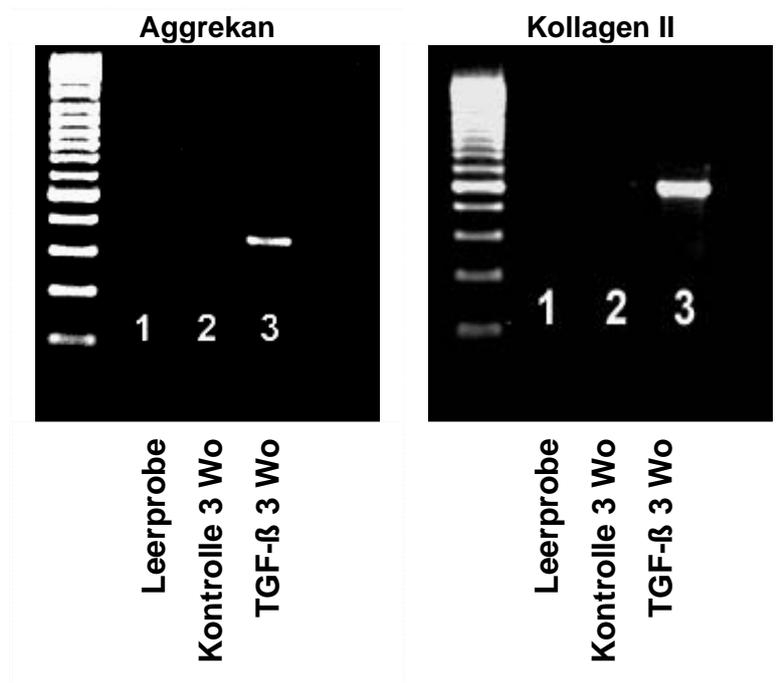


Abb. 10: Dargestellt ist die RT-PCR Analyse mit den chondrogenen Differenzierungsmarker Aggrekan und Kollagen II nach 3-wöchiger Kultivierung der Polylaktidkonstrukte in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF- β 1 bzw. Standardmedium (Kontrolle).

3.5 Defektheilung im Meniskus mit Polylaktidkonstrukten

3.5.1 Im zeitlichen Verlauf

In den rundförmig gestanzten Defekt des Meniskusgewebes wurden Polylaktidkonstrukte mit MSZ eingebracht und im zeitlichen Verlauf histologisch aufgearbeitet.

Hierbei zeigte sich einen Tag nach Einsetzen (Abb. 11A und B) eine hohe Zelldichte innerhalb des Kollagen I-Hydrogels. Jedoch war die Adhäsion an das Polylaktidpolymer nicht ausreichend, so dass es im Verlauf der histologischen Aufarbeitung zu einer Destruktion des Kollagen I-Hydrogelnetzes innerhalb des Stanzdefektes kam.

Im weiteren Verlauf konnte man eine Verfestigung der Konstrukte beobachten (Abb. 11C-F). Zwischen dem 1. und 10. Tag zeigte sich ein ähnliches histologisches Bild mit nur geringfügigen Unterschieden in der Besiedelung der EZM (Abb. 11A-D). Das Polylaktidkonstrukt war brüchig und eine Stabilität der Defektregion nicht garantiert.

An Tag 21 war im histologischen Bild eine vollständige Auskleidung der Defektregion mit dem Konstrukt sichtbar mit deutlicher Vermehrung der EZM (Abb. 11E und F). Jedoch zeigte sich über die Zeit eine Verminderung der Zelldichte innerhalb der Trägersubstanz. Verfahrenstechnisch ließ sich eine Verbesserung der Gewebestabilität während der histologischen Aufarbeitung feststellen, so dass die Netzstruktur während des Schneidevorgangs stabil blieb.

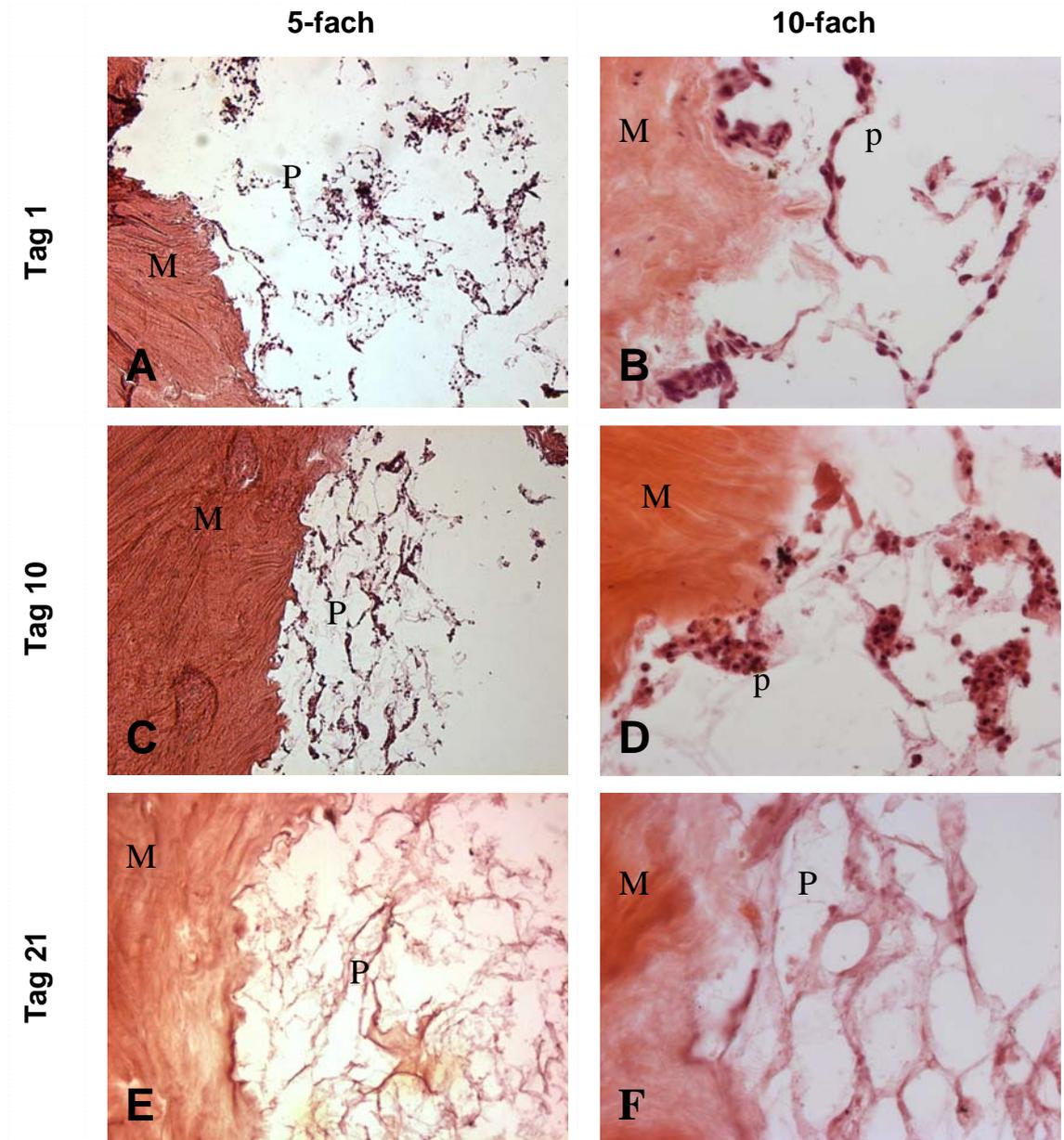


Abb. 11A-F: Dargestellt sind die HE-Färbungen der Stanzdefektreparatur im Zeitverlauf im Standardmedium. Gezeigt ist der Übergang zwischen Meniskusgewebe und Konstrukt in verschiedenen Vergrößerungen. M=Meniskus, P=Polylaktidkonstrukt mit MSZ.

3.5.2 Chondrogene Differenzierung

In den rundförmig gestanzten Defekt des Meniskusgewebes wurde ein Polylaktidkonstrukt eingebracht. Eine Gruppe wurde chondrogen differenziert und die Kontrollgruppe mit Standardmedium kultiviert (Abb. 12).

Sowohl in der chondrogenen Differenzierungsgruppe als auch der Kontrolle zeigte sich eine vollständige Auskleidung der Defektregion mit dem Polylaktidkonstrukt (Abb. 13). Der nahtlose Übergang von Meniskusgewebe zum Konstrukt mit einer direkten Anlagerung der Zellen an die Defektregion war in beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 12). Eine sekundäre Dislokation im Rahmen des Schneide- und Färbeprozesses trat nicht auf.

In der TGF- β 1 behandelten Gruppe (Abb. 12 C-F) zeigte sich eine erhöhte flächendeckende Besiedelung mit MSZ im Vergleich zur Kontrolle. Dies traf auch auf die Auskleidung der Polylaktidkonstrukte mit EZM zu. Hierbei konnte vor allem eine deutliche Erhöhung im zentralen Bereich des Polylaktidkonstruktes beobachtet werden, wobei der Randbereich keinen Unterschied aufwies.

Die Alzian Blau-Färbung zeigte eine leichte Anfärbung der sulfatierten Proteoglykanen der EZM in der chondrogenen Differenzierungsgruppe, wobei jedoch keine Knorpelhöfe vergleichbar zum nichtimplantierten Polylaktidkonstrukt der Vorversuche sichtbar waren (Abb. 12 F). Die Kontrollgruppe wies nur eine leicht Hintergrundfärbung des Kollagen I-Hydrogels mit dem Alzian Blau-Farbstoff auf (Abb. 12 E).

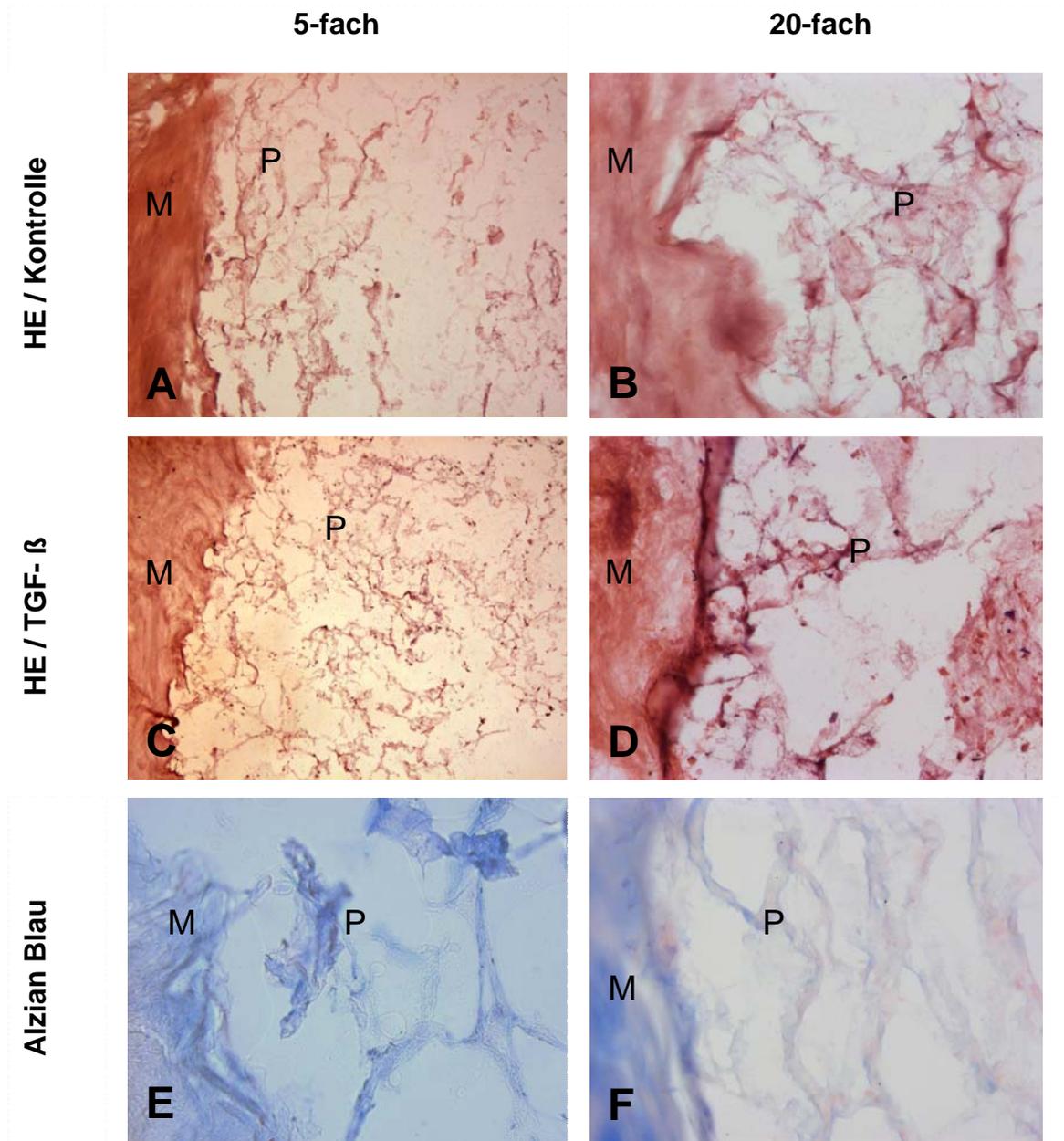


Abb. 12A-H: Chondrogene Differenzierung von Polylaktidkonstrukten. A-D: Die HE-Färbung der Kryoschnitte zeigen den Übergang Meniskus zum Polylaktidkonstrukt mit lückenloser Anlagerung der Kollagen I-Hydrogele an die Defektregion. Es erfolgte eine 3-wöchige Kultivierung in Standardmedium (A und B) bzw. Differenzierungsmedium mit TGF-β1 (C und D). E und F: Die Alzian Blau-Färbung zeigt den Übergang Meniskus-Polylaktidkonstrukt in Standardmedium (E) bzw. chondrogenem Differenzierungsmedium (F), M=Meniskus, P=Polylaktidkonstrukt.

4 Diskussion

4.1 Wahl der Zellquelle

Bei der Wahl der Zellquelle gibt es grundsätzlich verschiedene Ansätze. Zum einen können differenzierte Zellen aus dem Meniskusgewebe isoliert werden (Sweigart et al., 2001). Diese Zellen unterscheiden sich je nach Lokalisation anhand ihrer Morphologie und der Syntheseleistung an Glykosaminoglykanen. Die innere avaskuläre Meniskusregion produziert mehr Glykosaminoglykane als die peripheren Regionen. Aufgrund von Zellexperimenten werden isolierte Zellen der inneren Region des Meniskushorns favorisiert, die jedoch gerade bei einem Trauma stark gefährdet sind (Buma et al., 2002). Selbst bei erhaltener Gewebestruktur weist diese Region nur eine geringe Zellkonzentration auf. Ein weiterer Nachteil der isolierten Meniskuszellen ist die relativ langsame Proliferationszeit.

Aufgrund der schwierigen Gewinnung und der begrenzten Quantität stellen MSZ eine wichtige Alternative dar. Sie kombinieren entscheidende Faktoren zur breiten Anwendung des Tissue Engineering. Die leichte Isolierbarkeit, hohe Replikationsfähigkeit und die Differenzierbarkeit in mesenchymales Gewebe machen sie für das Tissue Engineering besonders interessant (Sweigart et al., 2001). Tierversuche an Ratten (Yamasaki et al., 2005) zeigten die Fähigkeit dieser Zellart zur chondrogenen Differenzierung *in vivo*.

MSZ können aus verschiedenen Geweben isoliert werden. In der Literatur am häufigsten beschrieben ist die Gewinnung aus dem Knochenmark (Guo et al., 2003; Buma et al., 2002). Ebenfalls mögliche Zellquellen sind das Fettgewebe und die Synovia (De Bari et al., 2001). Insgesamt zeigte sich in allen Studien ein vergleichbares Proliferationsverhalten, so dass aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit und logistischen Gründen MSZ aus dem Knochenmark von Hüft-TEP Patienten verwendet wurden (Nöth et al., 2002).

4.2 Wahl des Trägermaterials

Der Einsatz unterschiedlicher Trägermaterialien zur Rekonstruktion von defektem Weichteil- und Knochengewebe hat in den letzten Jahren für die zellbasierte Therapie immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Die Ansprüche an ein geeignetes Trägermaterial sind hoch. Zum einen sollte es gut verträglich und biologisch abbaubar sein, zum anderen ein poröses Profil aufweisen, welches eine optimale Voraussetzung für Zellmigration und Versorgung mit Nährflüssigkeit darstellt. Schließlich ist die Belastungsfähigkeit und im Verlauf ein Gleichgewicht zwischen Resorption des Trägermaterials und Wiederaufbau mit körpereigenem Gewebe von entscheidender Bedeutung (Arnoczky et al., 1999).

In erster Linie wurden zunächst natürliche Gewebe als Trägermaterialien untersucht, wie z.B. periostales (Sweigart et al., 2001) und perichondrales Gewebe (Bruns et al., 1998) sowie intestinale Submukosa (Sweigart et al., 2001). Diese Materialien sind jedoch dem Kollagengewebe an Zug- und Kompressionsfähigkeit unterlegen (Sweigart et al., 2001).

Kollagen stellt mit 60 bis 70% des Trockengewichts (Sweigart et al., 2001) den Hauptbestandteil des Meniskusgewebes dar. Es wird nach seiner erfolgreichen Anwendung bei der Substitution von Haut als eines der Biomaterialien mit den meisten Einsatzmöglichkeiten angesehen (Lee et al., 2001). In Tierversuchen wurden Meniskuszellen sowohl in Kollagen I als auch in Kollagen II Matrices implantiert und mit nativem Meniskusgewebe verglichen (Müller et al., 1999). Hierbei zeigte sich eine übereinstimmende Morphologie und Zelldichte in den Matrices im Vergleich zum nativen Gewebe. Weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Fähigkeiten des Kollagenmeniskus, einem auf Kollagen I basierenden, hufeisenförmigen Meniskusimplantat (CMI). Das Kollagengewebe wies eine gute biologische Abbaurate auf. Somit konnte das Gewebe durch neugebildetes Kollagen zeitgleich ersetzt werden, ohne die Stabilität zu gefährden (Martinek et al., 2005). In einer Studie von Reguzzoni et al. (2005) zeigte sich nach 6 Monaten eine gute Durchbauung der Lakunen mit fibroblastenähnlichen Zellen und umgebender Kollagenmatrix. In einer 5-Jahresstudie trat in einer Untersuchung von 8 Patienten keine Formänderung

des CMI auf und eine gute Stabilität des Kniegelenks konnte erreicht werden (Steadman et al., 2005). In eigenen Versuchen war es jedoch nicht möglich, eine flächendeckende in vitro Besiedelung der CMI mit MSZ sowie deren chondrogene Differenzierung zu erreichen. Hierbei wurde sowohl eine stationäre als auch eine dynamische Kultivierung getestet. Die Ergebnisse der beiden Gruppen, eine nur vereinzelte Zellansiedelung innerhalb des CMI, unterschieden sich nicht. Die genaue Ursache konnte trotz Rücksprache mit dem Hersteller nicht geklärt werden. Möglicherweise sind chemische Rückstände beim Reinigungsprozeß für eine toxische Wirkung auf die Zellen verantwortlich.

Als Grundträger der Zellen wurde ein Kollagen I-Hydrogel der Firma Arthro Kinetics eingesetzt. Dieses steht seit 2003 für die klinische Implantation von autologen Chondrozytentransplantaten bei Knorpelschäden des Kniegelenks zur Verfügung. Das zunächst flüssige Gel kann sehr exakt auf das Polymer portioniert und dieses so mit einer definierten Zellzahl beladen werden. Nach Mischen des Gels erfolgt eine rasche Aushärtung, so dass nach einer zügigen Applikation auf das Polymer in noch flüssigem Zustand, eine gute Verteilung und eine definitive Aushärtung innerhalb des Polylaktids gewährleistet ist. Dies führt zu einer homogenen Verteilung und Fixation der MSZ innerhalb des Konstruktes. Eine klinische 2-Jahresstudie über die Implantation eines chondrozytenbeladenen Kollagengels in fokalen Knorpeldefekten zeigte ein gutes bis sehr gutes klinisches Ergebnis bei 86,4% der Patienten (Andereya et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit zur Rekonstruktion eines verletzten Meniskus ist der Einsatz von synthetischen, biologisch abbaubaren Materialien, wie z.B. Fasern aus Karbon oder Polyurethane-poly(L-lactide). Andere Forschungsgruppen untersuchten Teflonnetze und aliphatische Polyurethane (Sweigart et al., 2001). Ibarra et al. (2000) entschieden sich in ihren Studien u.a. für Polyglykolsäure (PGA), Polylaktidsäure (PLA) sowie Polyurethanharz (PUR).

Kang et al. (2005) implantierten Hasen PGA-Fasern, die mit Meniskuszellen vorbesiedelt waren. Hierbei zeigten die Konstrukte zwar nach 10 Wochen eine

vergleichbare EZM mit Kollagen I und II zum nativen Meniskusgewebe, die sich jedoch nach 36 Wochen in der biochemischen Analyse deutlich unterschieden. Der entscheidende Vorteil synthetischer Polymere besteht in der variablen Anpassungsfähigkeit von Porösität, Abbaurate und Komprimierbarkeit (Cima et al., 1991).

Van Tienen et al. (2005) ersetzten den Meniskus bei Hunden mit einem Estan-Polymer wobei 3 Monate nach Implantation eine vollständige Füllung mit fibrovaskulärem Gewebe erreicht werden konnte. Nach weiteren 3 Monaten enthielt das Zentrum des Polymers knorpelähnliches Gewebe mit Kollagen II-Fasern und Proteoglykanen. Jedoch wurde nach 6 Monaten eine Degeneration des Gelenkknorpels ähnlich der Kontrollgruppe mit Meniskusentfernung beobachtet.

Aufgrund der individuellen Anpassbarkeit von synthetischen Polymeren an das Zielgewebe und die in zahlreichen Forschungsstudien gesicherten guten Eigenschaften von Kollagengeweben, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination beider Materialien verwendet. Als Grundgerüst wurde ein synthetisches Polylaktid (OPLA[®]) der Firma BD Bioscience mit einer Porengröße zwischen 100 und 200 µm verwendet. In der Literatur wird ein Optimalmaß von 150 und 500 µm definiert (Sweigart et al., 2001). Das Polymer hat ein offenes Volumen von mehr als 75%, so dass eine ausreichende Versorgung und Ansprechbarkeit der Zellen auf das Medium und der Differenzierungsfaktoren gewährleistet ist.

4.3 Polylaktidkonstrukte

In der ersten Versuchsreihe sollte die optimale Konzentration von MSZ zur Besiedelung eines Polylaktidkonstruktes im Kollagen I-Hydrogel ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass trotz der schonenden Besiedelungstechnik mit Kollagen I-Hydrogel eine deutliche Reduktion der Zellen im Polymer auftrat. Zur besseren Vereinheitlichung der Ergebnisse wurden jeweils nur Zellen eines Zellspenders pro Versuch verwendet. Die von uns verwendete Zelldichte entsprach $1,7 \times 10^7$ MSZ pro ml, was im Vergleich zur Arbeitsgruppe Nöth et al. (2007) deutlich über der Konzentration von $2,5 \times 10^5$ MSZ pro ml lag. Diese war jedoch nötig, um eine gute Auskleidung mit hoher Zelldichte am Rand und einer akzeptablen Besiedelung des Zentrums zu erreichen. Eine höhere Konzentration an Zellen zeigte aufgrund der zu hohen Viskosität eine Reduktion in der Histologie.

In einer nächsten Versuchsreihe erfolgte die chondrogene Differenzierung der MSZ innerhalb der Polylaktidkonstrukte. Nöth et al. (2007) zeigten die Überlegenheit von 10 ng/ml TGF- β 1 als Differenzierungsfaktor zur chondrogenen Differenzierung im Vergleich zu BMP-2 im Kollagen I-Hydrogel. Hierbei wurden u.a. die Markergene Kollagen II und Aggrecan verwendet. In weiteren Studien erhöhte TGF- β 1 die Proteoglykansynthese um bis zu 100% und förderte die Transformation in einschichtige Fibrochondrozyten (Sweigart et al., 2001).

Es zeigte sich nach einer 3-wöchigen Kultivierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium und Zugabe von 10 ng/ml TGF- β 1 im Vergleich zur serumhaltigen Kontrollgruppe eine sowohl morphologische und immunhistochemische als auch mit Hilfe von RT-PCR gesicherte, chondrogene Differenzierung. Die histologischen Schnitte sowie die RT-PCR zeigten vergleichbare Resultate, wie zuvor von Nöth et al. (2007) beschrieben. Eine geringfügige Abnahme der EZM und Zellkonzentration im Vergleich könnte durch das verwendete, während des Färbeprozesses aufgelöste Polylaktidpolymer zurückzuführen sein.

Auffällig war in der Histologie eine deutliche höhere Zellkonzentration jeglicher Versuchsreihen mit chondrogener Differenzierung im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Da in der Regel nur eine Differenzierung mit EZM-Produktion oder eine Proliferation möglich ist, könnte das histologische Bild durch unterschiedliche Vorgänge beeinträchtigt sein.

Zum einen wäre eine Kontraktion des Gels durch den Zusatz von 10 ng/ml TGF- β 1 möglich. Dieses Phänomen wurde bereits durch Nöth et al. (2007) beschrieben und könnte mit der Durchführung von DNA- und Proteinmessungen verifiziert werden. Zum anderen sind möglicherweise in der nicht differenzierten Gruppe Zellen apoptotisch geworden. Die Rolle der Apoptose wird derzeit in weiterführenden Studien untersucht. Der Beweis könnte durch den von Nöth et al. (2007) beschriebenen Apoptose-Test mit doppelfluoreszierender Färbung mit Annexin V Cy3 and 6-CFDA geführt werden. Die genannte Arbeitsgruppe zeigte, dass die Apoptoserate von MSZ in Kollagen I-Hydrogel unabhängig von der chondrogenen Differenzierung mit 10 ng/ml TGF- β 1 verglichen mit Standardmedium mit 10 % FCS war.

4.4 Meniskusdefektheilung mit Polylaktidkonstrukten

Eine zellulär besiedelte Kombination aus synthetischem Polylaktidkonstrukt und natürlichem Kollagen I-Hydrogel bot eine neue, in der Literatur noch nicht beschriebene Möglichkeit für einen experimentellen Ansatz zur Therapie von Meniskusdefekten.

In dieser Arbeit wurde auf eine Kombination aus Polylaktid-Polymer und zellbeladenem Kollagen I-Hydrogel zurückgegriffen. Diese Kombination vereinte die Vorteile der von Anfang an bestehenden stabilen Trägersubstanz des Polylaktidpolymers mit der sofortigen Auskleidung der Defektregion mit differenzierungsfähigen MSZ eingebettet in ein Kollagen I-Hydrogel. Durch die chondrogene Differenzierung der MSZ sollte sich innerhalb des Meniskusstanzdefektes nach 3 Wochen eine beginnende EZM mit Knorpelzellen bilden. Ibarra et al. (2000) besiedelten ein PGLA-Polymer mit MSZ und implantierte das Konstrukt subkutan. Danach erfolgte die Meniskusdefektreparatur mit dem vorbesiedelten Polymer. Es zeigte sich eine proteoglykanreiche Matrix mit Kollagenfasern. Um die subkutane Implantation zu vermeiden und ebenfalls eine proteoglykanreiche EZM mit Kollagenfasern zu erreichen, verwendeten wir von Anfang an MSZ, die in ein Kollagen I-Hydrogel eingebettet waren. Nöth et al. (2007) zeigten, dass MSZ in Kollagengelen chondrogen differenzieren und eine proteoglykanreiche EZM ausbilden können. Zur Stabilisierung des Kollagen I-Hydrogels innerhalb des Defektes wurde ein Polylaktidpolymer verwendet. Gong et al. (2007) verwendeten in Ihren Untersuchungen ebenfalls ein Polylaktid-Polymer in Kombination mit einem Hydrogel, wobei jedoch Chondrozyten anstelle von MSZ verwendet wurden. Nach einem vierwöchigen Tierversuch war neuer Knorpel innerhalb des Polymers gewachsen.

Besonders in der zeitlichen Entwicklung war bereits am zehnten Tag eine gute Ausfüllung des Meniskusdefektes mit dem Polylaktidkonstrukt nachweisbar, obwohl das Polylaktid während des Färbens herausgelöst wurde. Vor allem in der differenzierten Gruppe mit 10 ng/ml TGF- β 1 konnte eine deutlich dichtere Stanzdefektfüllung in der Histologie beobachtet werden. Dies könnte aber wie in den Vorkapitel beschrieben auf eine Kontraktion des Gewebes zurückzuführen

sein. Als Aspekt gegen die Kontraktion kann genannt werden, dass während der zeitlichen Beobachtung des Polymers im Defekt keine Änderung der Anhaftung des Kollagengels an die Defektregion auftrat, welche sich bei Kontraktion ergeben hätte müssen.

Arnoczky et al. (1999) beschrieben den fördernden Einfluss von TGF- β 1 sowohl auf die EZM-Produktion als auch die Stimulierung des fibroblastären Zelltyps. Dieser Effekt könnte die histologischen Ergebnisse erklären, jedoch wurden, wie bereits genannt keine quantitativen Messungen der DNA- oder des Proteingehalts durchgeführt.

Im Vergleich zu den nicht implantierten zeigte sich bei den Polylaktidkonstrukten innerhalb des Meniskusstanzdefekt histologisch eine Reduktion sowohl der EZM als auch der Zellkonzentration. Dies könnte zum einen auf eine geringere Versorgung der MSZ mit Medium und Differenzierungsfaktor hindeuten. Weiterhin wären auch eine mechanische Irritation während der Implantation des Polylaktidkonstrukt in den Meniskusstanzdefekt denkbar, bei dem das Konstrukt zum Teil komprimiert wurde. Hierbei könnte ein Teil des Volumens des noch nicht völlig verfestigte Kollagen I-Hydrogel aus dem Meniskus geschwemmt werden. Weiterhin könnten Rückstände, die bei der Herstellung des Polylaktidpolymere gebildet werden, eine Verzögerung des Wachstums hervorrufen. Zur Abklärung der Ursache wäre die Durchführung eines Apoptosetests hilfreich.

4.5 Methodische Aspekte und weiterführende Überlegungen

Für die durchgeführten Versuche kommen alternative Ansätze in Betracht. Zunächst wurde aufgrund eigener Vorergebnisse die stationäre Kultivierung in sterilen Schalen favorisiert. Hierbei zeigte sich bei nicht implantierten Polylaktidkonstrukten eine ausreichende Diffusion des Mediums durch das Polymer. Dies ermöglichte eine gute Versorgung der MSZ und deren Differenzierung in Chondrozyten. Im implantierten Zustand konnte eine Reduktion der MSZ-Konzentration im Vergleich zur nicht implantierten Kontrollgruppe beobachtet werden, eine gleichmäßige und vollständige Ausfüllung der Defektregion mit MSZ und EZM war jedoch weiterhin histologisch nachweisbar. In Bezug auf eine Optimierung der Versorgungsverhältnisse des Polylaktidkonstruktes im Meniskus wäre eine dynamische Zellbesiedlung denkbar, wie sie z.B. von Mahmood et al. (2005) bei der Besiedelung eines Polymers mit Chondrozyten Verwendung fand.

Des Weiteren bestand grundsätzlich die Wahl zwischen verschiedenen Differenzierungsfaktoren. Pangborn et al. (2005) zeigten, dass durch die Verwendung von TGF- β 1 eine Erhöhung sowohl der GAG als auch der Kollagen II Produktion erreicht werden konnte. In einer Vergleichsstudie mit dem Differenzierungsfaktor BMP-2 konnte durch die Verwendung von TGF- β 1 eine Erhöhung der zwei vorgenannten chondrozytären Marker beobachtet werden (Nöth et al., 2007). Vergleichbar zu den in der Literatur beschriebenen Studien zeigte sich in allen Versuchen eine Bildung von EZM mit einer hohen Zellkonzentration und einer Differenzierung der MSZ in den nicht implantierten Polylaktidkonstrukten zu Chondrozyten. Weitere Kombinationsmöglichkeiten der Wachstumsfaktoren wären denkbar. Zusätzliche Effekte auf ein verstärktes Zellwachstum könnte durch die Zugabe stimulierenden Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF und HGF erreicht werden. Langobardi et al. (2006) beschrieben die Verwendung von IGF bei der chondrogenen Differenzierung mit vergleichbaren Resultaten zu TGF- β 1 und dessen Wirkungsunabhängigkeit von TGF- β 1.

Aufgrund der Schwierigkeiten der späteren in vivo Differenzierung mit externer Substitution von TGF- β 1 wäre eine genetisch-induzierte Eigenproduktion mit adenoviralen Vektoren (Palmer et al., 2004) möglich. In verschiedenen Studien

wurden bereits erfolgreich der Gentransfer für TGF- β 1 sowie BMP und IGF in MSZ beschrieben (Bleiziffer et al., 2007). Dies würde weiterhin das Problem des Versorgungsengpasses in Bezug auf eine konstante TGF- β 1-Konzentration lösen. Ausserdem wäre ein genetisch-induziertes Wachstum von Blutgefäßen in das vorher avaskuläre Gebiet, bzw. eine Beschleunigung der körpereigenen Blutgefäßbildung denkbar. Diese Strategien sind vor allem für einen späteren Tierversuch wichtig, da hierbei die Einflußnahmen auf die Konzentrationen von Differenzierungsfaktoren im Vergleich zu den Laborbedingungen deutlich geringer sind. Ob sich die Ergebnisse in einem in vivo Versuch wiederholen lassen und eine Regeneration des Meniskusgewebes mit chondrogen differenzierten MSZ im Polylaktidkonstrukt möglich ist, soll in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der Meniskus stellt aufgrund seiner besonderen Bedeutung in der Biomechanik einen wichtigen Teil des Kniegelenkes dar. Er gleicht die Inkongruenz der beiden Gelenkspartner aus und führt somit zu einer ausgewogenen Belastungsverteilung mit Reduktion von Belastungsspitzen und einer höheren Stabilität der Gelenkpartner.

Eine Verletzung des Meniskus bedingt eine eingeschränkte Funktion mit Erhöhung der Belastung des Gelenkknorpels. Trotz der statistisch sehr häufigen Verletzungen gibt es langfristig betrachtet noch keine erfolgreiche Therapie. Aufgrund der eingeschränkten Selbstheilungsfähigkeit des bradytrophen Meniskusgewebes mit eingeschränkter Durchblutung bleibt oft nur die operative Teilresektion als Therapie der Wahl. Dieses Verfahren führt zu einer veränderten Statik im Kniegelenk und kann sekundär zu einer Erhöhung der Inzidenz für frühzeitige Arthrose führen.

Aus diesem Grund ist man heute auf der Suche nach alternativen Methoden für die Versorgung von Meniskusschäden. Tissue Engineering als interdisziplinäres Forschungskonzept bietet vielfältige Möglichkeiten, die Funktion verschiedenster Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern. Insbesondere MSZ besitzen ein großes Potential für die Rekonstruktion von defektem Gewebe des Bewegungsapparates.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob eine in vitro Rekonstruktion von humanen Menisci mit Hilfe von MSZ und einer Poly-laktid-Kollagen I-Hydrogel-Matrix prinzipiell möglich ist. Weiterhin sollte der Einfluss des chondrogenen Differenzierungsmediums mit Zusatz von 10 ng/ml TGF- β 1 auf das Ergebnis der Rekonstruktion beobachtet, und die Voraussetzung einer möglichen in vivo tierexperimentellen Studie dieses Rekonstruktionsverfahrens geklärt werden.

Zunächst wurde die Ausfüllung des Poly-laktid-Polymers mit dem Kollagen I-Hydrogel untersucht. Es zeigte sich eine vollständige Auskleidung des offenen Volumens des Polymers, welches als Basis für eine MSZ Besiedelung eine gute Voraussetzung darstellte. In einem zweiten Schritt wurde die optimale Konzentration an MSZ pro Polymer ermittelt. Bei einer Zellzahl von $1,7 \times 10^7$

MSZ pro ml konnte eine dichte Besiedelung der Randbereiche als auch eine ausreichende Besiedelung der inneren Region erreicht werden.

Nach Feststellung der optimalen MSZ-Konzentration wurde die chondrogene Differenzierung mit Hilfe von Differenzierungsmedium unter Zusatz von 10 ng/ml TGF- β 1 in einem freiliegenden Polylaktidkonstrukt mit einer Kontrollgruppe in Standardmedium hinsichtlich Morphologie, Immunhistochemie und RT-PCR verglichen. Hierbei ergab sich ein deutlicher Nachweis der chondrogenen Differenzierung mit positiver Alzian Blau- und Kollagen II-Färbung sowie einer Exprimierung chondrogener Marker in der PCR im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im nächsten Schritt wurde in einen Stanzdefekt eines menschlichen Meniskus ein Polylaktidkonstrukt mit $1,7 \times 10^7$ MSZ pro ml implantiert und in der zeitlichen Entwicklung histologisch beobachtet. Es zeigte sich eine relativ schnelle Besiedlung des Polylaktid-Kollagen I-Hydrogels mit einer hohen Dichte an MSZ, wohingegen die Gelmatrix am Anfang noch nicht vollständig ausgehärtet war. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kollagenmatrix bei gleichzeitiger Konstanz der Zellzahl.

Die chondrogene Differenzierung der MSZ im Polylaktidkonstrukt zeigte in der Histologie eine erhöhte Zellzahl in der chondrogenen Differenzierungsgruppe mit vermehrter EZM-Produktion. Im Vergleich zum nichtimplantierten war jedoch eine deutliche verminderte Bildung von Kollagen II und sulfatierte Proteoglykane in der Histologie sichtbar.

Die gewonnenen Ergebnisse dienen als Grundlage für die Reparatur eines Meniskusdefektes, mit dem langfristigen Ziel der Implantation eines in vitro hergestellten Polylaktidkonstruktes aus Kollagen I-Hydrogel und MSZ in den menschlichen Meniskus, um somit die vollständige Regeneration des Meniskusgewebes zu ermöglichen. Ob die auf diese Weise hergestellten Konstrukte eine Degeneration des Korpelgewebes verhindern bzw. verzögern können, wird sich in der Zukunft nach einer Optimierung der Kultivierungsmethoden in Tierversuchen zeigen müssen.

6 Literaturverzeichnis

Annandale T. An operation for displaced semilunar cartilage. Br Med J 1:779, 1885.

Andereya S, Maus U, Gavenis K, Gravius S, Stanzel S, Müller-Rath R, Miltner O, Mumme T, Schneider U. First clinical experiences with a novel 3D-collagen gel (CaReS) for the treatment of focal cartilage defects in the knee. Z Orthop Ihre Grenzgeb 144:272-280, 2006.

Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. Am J Sports Med 10:90-95, 1982.

Arnoczky SP. Building a meniscus. Biologic considerations. Clin Orthop Relat Res 367:244-253, 1999.

Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U. Gene transfer strategies in tissue engineering. J Cell Mol Med 11:206-223, 2007.

Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. Tissue Eng 8:73-84, 2002.

Bruns J, Kahrs J, Kampen J, Behrens P, Plitz W. Autologous perichondral tissue for meniscal replacement. J Bone Joint Surg-B 80:918-923, 1998.

Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RPH. Tissue engineering of the meniscus. Biomaterials 25:1523-1532, 2004.

Caplan AI. The mesengenic process. Clin Plast Surg 21:429-435, 1994.

Chaudhry GR, Yao D, Smith A, Hussain A. Osteogenic cells derived from embryonic stem cells produced bone nodules in three-dimensional scaffolds. *J Biomed Biotechnol* 4:203-210, 2004.

Chen MI, Brunch TP, Hutton WC. Is it important to secure the horns during lateral meniscal transplantation? A cadaveric study. *Arthroscopy* 12:174-181, 1996.

Chiary C, Koller U, Dorotka R, Eder C, Plasenzotti R, Lang S, Ambrosio L, Tognana E, Kon E, Salter D, Nehrer S. A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage* 14:1056-1065, 2006.

Cui Y, Cao Y, Shang Q, Cui L, Liu W. Repair of meniscal defects with autologous tissue-engineered fibrocartilage. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82:191-193, 2002.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 54:1209-1221, 2006.

De Groot JH, de Vrijer R, Pennings AJ, Klompaker J, Veth RP, Jansen HW. Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prothese. *Biomaterials* 17:163-173, 1996.

Ghosh P, Taylor TK. The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop Relat Res* 224:52-63, 1987.

Gong Y, He L, Li J, Zhou Q, Ma Z, Gao C, Shen J. Hydrogel-filled polylactide porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B* 82:192-204, 2007

Guo XM, Wang CY, Wang YH, Duan CM, Zhao Q, Sun DM. Experimental study of the isolation, culture and in chondrogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 38:63-66, 2003.

Herwig J, Egnér E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 43:635-640, 1984.

Hoshino A, Wallace WA. Impact-absorbing properties of the human knee. *J Bone Joint Surg-B* 69:807-811, 1987.

Ibarra C, Koski JA, Warren RF. Tissue engineering meniscus: cells and matrix. *Orthop Clin North Am* 31:411-418, 2000.

Kang S, Sun-Mi S, Jae-Sun LI, Eung-Seok L. Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model. *J Biomed Mater Res A* 77:659-671, 2006.

King D. The function of semilunar cartilages. *J Bone Joint Surg* 18:333-342, 1936.

Li W, Tuli R, Okafor C, Derfoul A. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26:599-609, 2004.

Longobardi L, Lynda O, Srikantha A, Brian J, Kimberly S, Anna C. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling. *J Bone Miner Res* 21:626-636, 2006.

Mahmood TA, Shastri VP, van Blitterswijk CA, Langer R, Riesle J. Tissue engineering of bovine articular cartilage within porous poly(ether ester) copolymer scaffolds with different structures. *Tissue Eng* 11:1244-1253, 2005.

Martinek V, Ueblacker P, Braun K, Nitschke S, Mannhardt R, Specht K, Gansbacher B, Imhoff AB. Second generation of meniscus transplantation: in vivo study with tissue engineered meniscus replacement. Arch Orthop Trauma Surg 126:228-234, 2006.

Moon MS, Kim JM, Ok IY. The normal and regenerated meniscus in rabbits. Morphologic and histologic studies. Clin Orthop Relat Res 182:264-269, 1984.

Müller SM, Schneider TO, Shortkroff S, Breinan HA, Spector M. Alpha-smooth muscle actin and contractile behavior of bovine meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices. J Biomed Mater Res 45:157-166, 1999.

Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, Horibe S, Tada K, Ochi T, Yoshikawa H. Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. Clin Orthop Relat Res 391:208-218, 2001.

Nakhostine M, Gershuni DH, Anderson R, Danzig LA, Weiner GM. Effects of abrasion therapy on tears in the avascular region of sheep menisci. Arthroscopy 6:280-287, 1990.

Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schütze N, Jakob F, Eulert J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. J Biomed Mater Res A Epub, 2007.

Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH. Groth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. Biochem Biophys Res Commun 320:914-919, 2004.

Oretorp N, Alm A, Ekstrom H, Gillquist J. Immediate effects of meniscectomy on the knee joint. The effects of tensile load on knee joint ligaments in dogs. Acta Orthop Scand 49:407-414, 1978.

Palmer G, Steinert A, Pascher A, Gouze E. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 12:219-228, 2005.

Pangborn CA, Athanasiou DA. Effects of growth factors on meniscal fibrochondrocytes. *Tissue Eng* 11:1141-1148, 2005.

Petersen W, Tillmann B. Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl.)* 197:317-324, 1998.

Ramrattan NN, Heijkants RG, van Tienen TG, Schouten AJ, Veth RP, Buma P. Assessment of tissue ingrowth rates in polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng* 11:1212-1223, 2005.

Reguzzoni M, Manelli A, Ronga M, Raspanti M, Grassi F. Histology and ultrastructure of a tissue-engineered collagen meniscus before and after implantation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74:808-816, 2005.

Steadman JR, Rodkey WG. Tissue engineered collagen meniscus implants: 5- to 6- Year feasibility study results. *Arthroscopy* 21:515-525, 2005.

Sommerlath K, Gillquist J. The effects of an artificial meniscus substitute in a knee joint with a resected anterior cruciate ligament. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 289:276-284, 1993.

Sonoda M, Harwood FL, Amiel ME, Moriya H, Temple M, Chang DG, Lottman LM, Sah RL, Amiel D. The effects of hyaluronan on tissue healing after meniscus injury and repair in a rabbit model. *Am J Sports Med* 28:90-97, 2000.

Sweigart BS, Kyriacos A, Athanasiou PE. Review toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng* 7:111-129, 2001.

Van Damme A, Thorrez L, Ma L, Vandeburgh H, Eyckmans J. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells* 24:896-907, 2005.

Van Tienen TG, Heijikants RG, de Groot JH, Pennings AJ, Poole AR, Veth RP, Buma P. Presence and mechanism of knee articular cartilage degeneration after meniscal reconstruction in dogs. *Osteoarthritis Cartilage* 11:78-84, 2003.

Vickers SM, Squitieri LS, Spector M. Effects of cross-linking type II collagen-GAG scaffolds on chondrogenesis in vitro: dynamic pore reduction promotes cartilage formation. *Tissue Eng* 12:1345-1355, 2006.

Wang WM, Hu YY. Effect of marrow stromal cells derived chondrocytes on repair of full-thickness defects of rabbit articular cartilage. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 18:58-62, 2004.

Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ Jr. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *J Orthop Res* 6:13-23, 1988.

Weinand C, Peretti GM, Adams SBJr, Bonassar LJ. An allogenic cell-based implant for meniscal lesions. *Am J Sports Med* 34:1779-1789, 2006.

Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 61:1003-1010, 2000.

Yamaski T, Deie M, Shinomiya R, Izuta Y. Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *J Biomed Mater Res A* 75:23-30, 2005.

Zaffagnini S, Giordano G, Vascellari A, Bruni D, Neri MP, Iacono F, Kon E, Presti ML, Marcacci M. Arthroscopic collagen meniscus implant results at 6 to 8 years follow up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15:175-183, 2007.

Zheng ZH, Zhu P, Wang YH, Fan CM, Ding J, Shanq P. In vitro induction of directional differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 21:79-82, 2005.

Danksagungen

Bedanken möchte ich mich für die exzellente Betreuung durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter des König-Ludwig-Hauses, vor allem bei Andrea Heymer und Martina Regensburger, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Herrn Dr. med Nöth, der mit viel Geduld meine Dissertation betreute.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Eulert, Herrn Prof. Dr. med. Jakob und bei Herrn PD Dr. rer. nat. Schütze für die Möglichkeit, im Labor des König-Ludwig-Hauses zu forschen.

Ganz besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung meiner Familie.

Meinen Eltern und Geschwistern, die mit ihrer tatkräftigen Unterstützung viele Probleme lösten und jederzeit zur Verfügung standen.

Bei Frauke Müller für ihre engagierte Hilfe, wann immer ich sie gebraucht habe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname	Jens, Christian
Name	Stüber
Telefon	00049.176.62124885
E-mail	Tschenze@gmx.de
Geburtstag	10.03.1980
Adresse	Rhönstrasse 8 97080 Würzburg

Ausbildung

Ab 2007	Assistenzarzt im König-Ludwig Haus, Lehrstuhl für Orthopädie
2006-2007	PJ in Chur (Schweiz), Rochester (USA), Würzburg
2001-2007	Medizinstudium an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
2000-2001	Militärdienst
1990-2000	Friedrich-List-Schule Ulm (Abiturschnitt: 1,0; Schulbester)

Fremdsprachen

Französisch	Fließend (Famulaturen in Frankreich, diverse Intensivkurse)
Englisch	Fließend (Famulaturen in Amerika, diverse Intensivsprachkurse)

Famulaturen

2004	Famulatur in der Pulmologie in Iowa city
2004	Famulatur in der Orthopädie in Chur
2003	Famulatur in der Neurochirurgie in Sense
2003	Famulatur in der Gastroenterologie in Paris
2003	Famulatur in der Gastroenterologie in Aix-en-Provence

Hobbies

Einradfahren und Jonglieren mit einem 9ten Platz bei der Weltmeisterschaft 1998

Diverse Instrumente: Klavier, Geige und Gitarre

Schwimmen (Universitätsmannschaft Würzburg)

29.11.07