

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. M. NERLICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Analyse der Effektivität hydrostatischer
Druckbelastung auf mesenchymale Stammzellen und
chondrozytäres Gelenkknorpelgewebe**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin**

**der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Michael Heinrich
aus Aham**

2009

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. M. NERLICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Analyse der Effektivität hydrostatischer
Druckbelastung auf mesenchymale Stammzellen und
chondrozytäres Gelenkknorpelgewebe**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin**

**der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Michael Heinrich
aus Aham**

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Angele

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 2009

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Meniskus-anatomie und Physiologie	1
1.2 Übersicht über momentane Therapiekonzepte und deren Folgen	2
1.3 Entwicklung und Anwendungen von Tissue Engineering	5
1.4 Überblick der mechanobiologischen Einsatzmöglichkeiten	7
1.5 Zusammenfassung und Zielsetzung der Arbeit	8
2. MATERIAL	11
2.1 Hydrostatischer Druckapparat	11
2.2 Chemikalien und Reagenzien	13
2.3 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	14
2.4 Puffer und Lösungen	15
2.5 Medien und Seren	16
2.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren	17
2.7 Medikamente	17
2.8 Zellmaterial	17
2.9 Tiere	18
3. METHODEN	19
3.1 Zellgewinnung und zellbiologische Methoden	19
3.1.1 <i>Meniskuszellen</i>	19
3.1.1.1 <i>Zellgewinnung</i>	20
3.1.1.2 <i>Amplifikation</i>	20
3.1.1.3 <i>Redifferenzierung</i>	21
3.1.2 <i>Mesenchymale Stammzellen</i>	21
3.1.2.1 <i>Zellgewinnung</i>	22
3.1.2.2 <i>Amplifikation</i>	23

3.1.2.3 <i>Differenzierung</i>	23
3.1.3 <i>Chondrogenesemodell</i>	23
3.1.4 <i>Lebendzellzahlbestimmung</i>	24
3.2 Hydrostatisches Belastungsverfahren	24
3.3 Histologische Methoden	25
3.3.1 Herstellung der Schnitte	26
3.3.2 DMMB-Färbung	27
3.3.3 Toluidinblau-Färbung	27
4. ERGEBNISSE	28
4.1 Aggregatgrößenanalyse	28
4.1.1 <i>Fotoanalyse der Aggregatgröße</i>	28
4.2 Histologische Färbung	31
4.2.1 <i>DMMB-Färbung</i>	31
4.2.2 <i>Toluidinblau-Färbung</i>	35
5. DISKUSSION	38
6. ZUSAMMENFASSUNG	48
7. LITERATURVERZEICHNIS	50
8. ANHANG	58
8.1 Abkürzungen	58
8.2 Lebenslauf	59
8.3 Danksagungen	60

1. EINLEITUNG

1.1 Meniskusanatomie und Physiologie

Die Menisken des Kniegelenks bestehen aus Faserknorpel und sind beim Menschen typischerweise halbmondförmig mit einem keilförmigen Querschnitt. Die durchschnittlichen Ausdehnungen eines Außenmeniskus liegen in a.p.-Richtung bei 35,7 mm, mit einem Umfang von 91,7mm. Die medialen Menisken sind mit einer Länge von 45,7 mm und einem Umfang von 99,0 mm etwas größer (1), allerdings mit 6,5 mm medial und 6,75 mm lateral in der Höhe (dorsal gemessen) etwas kleiner (2). Die Oberfläche der Menisken ist entsprechend der konvexen Form der Femurkondylen konkav gestaltet. Die Meniskenunterseite ist flach und liegt dort dem Plateau der Tibia auf. Dadurch können sie als bewegliche Druck- und Kongruenzgleichsscheiben zum Ausgleich von Zugbelastungen und Kompressions-Rotations-Mechanismen fungieren (3). Obwohl die Menisken im Kniegelenk lange Zeit als funktionslos angesehen wurden (4), wird heute ihr Einfluss und ihre im wahrsten Sinne des Wortes tragende Rolle anerkannt. Viele Studien konnten die funktionelle Bedeutung des Meniskus innerhalb des Kniegelenks für Kniestabilität (5-7), Kraftverteilung (8-10), Schockabsorption (11,12), Lubrikation (13) und Propriozeption (14,15) nachweisen. Funktionell wird dies durch eine deutliche Vergrößerung der Kontaktfläche durch die Menisken zwischen Femur und Tibia erreicht (16).

Die wesentlichen Fixationspunkte der Menisken finden sich an der vorderen und hinteren Insertion der Tibia. Hier strahlen Fasern der lateralen und der medialen vorderen Insertion in das vordere Kreuzband aus (17). Die Funktion dieser meniskofemorale Bänder wird in einer Bewegungskontrolle des Außenmeniskus, sowie stabilisierenden Effekten auf die a.p.-Translation und Rotation vermutet (18).

Die Blutversorgung des Meniskus erfolgt über die oberen und unteren Äste der lateralen und medialen Aa. geniculares. Diese vereinigen sich an der Basis der Menisken zu einem perimeniskalen Kapillarplexus. Beim Erwachsenen sind allerdings nur 10 – 25 % des Gesamtmeniskusquerschnitts durchblutet (19), wobei es sich dabei um den basisnahen, äußeren Anteil handelt. Der zentrale Anteil ist avaskulär. Diese Bereiche werden entsprechend ihres Durchblutungsgrades auch als rot-rote und weiß-weiße Zone bezeichnet, mit einem intermediären Übergangsbereich, der rot-weißen Zone. Die Ernährung des avaskulären Anteils erfolgt über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit (20). Die Mikroanatomie des Meniskus wird mit einem Trockenmasseanteil von 60-80% hauptsächlich von Kollagen gebildet, wobei neben kleineren Anteilen von Kollagen Typ II, III und V vor allem Kollagen Typ I mit 80% vorkommt (21). Elektronenmikroskopisch zeigt sich dabei eine Dreiteilung des Gewebes: im femoralen und tibialen Anteil der Meniskusoberfläche findet sich ein fibrilläres Netzwerk von 10 µm Dicke. Es schließt sich eine lamelläre Schicht an, die in der Peripherie 150 – 200 µm aufweist und zur Zirkumferenz hin auf 20 – 50 µm abnimmt. Den Hauptteil stellt der zentrale Bereich dar, der eine zirkumferente Ausrichtung der Kollagenfasern aufweist (18). Auf Grund dieser spezifischen anatomischen Gegebenheiten, insbesondere der Gefäßarchitektur, stellt die Therapie von Meniskuläsionen, speziell im avaskulären Bereich, ein bislang ungelöstes Problem in der Traumatologie dar. Mit 70% (22) stellen Läsionen in diesem Bereich den Großteil der Meniskusverletzungen dar. Gegenwärtig ist die partielle Meniskusentfernung (23) die übliche Behandlung solcher Verletzungen.

1.2 Übersicht über momentane Therapiekonzepte und der Folgen

Meniskusverletzungen bilden die häufigste Ursache für operative Eingriffe am Kniegelenk, wobei Männer 2,8-mal häufiger betroffen sind als Frauen (23,24).

Akute Meniskusverletzungen entstehen nur bei massiver Krafteinwirkung, zum Beispiel im Rahmen eines Verdrehtraumas oder bei Bandrupturen. Bei entlastetem Knie und einer kombinierten Außenrotations- und Flexionsbewegung unter Valgusstress treten eher Verletzungen des lateralen Meniskus, dann häufig in Kombination mit Verletzungen des vorderen Kreuzbandes, auf (25). Verletzungen unter Belastung führen eher zu medialen Meniskusrissen.

Für Meniskusrisse stehen momentan zwei Therapieansätze zur Verfügung: die Meniskusnaht und die (partielle) Meniskusresektion. Studien (24,26) zeigen, dass den überwiegenden Anteil mit bis zu 94% der Eingriffe die partielle Meniskusresektion darstellt. Entscheidend für die Therapiewahl zwischen Meniskusnaht oder partieller bzw. totaler Resektion ist die Lokalisation und das Ausmaß der Ruptur, daneben ob Begleitverletzungen vorliegen, es sich um eine frische oder alte Ruptur handelt, sowie Alter und körperliche Aktivität des Patienten. Man unterscheidet demnach komplette oder inkomplette longitudinale Meniskusrupturen, den so genannten Korbhenkelriss, sowie radiäre und horizontale Rupturen.

Rupturen, die im peripheren, also vaskularisierten Bereich des Meniskus liegen sind für eine Therapie mittels Naht besser geeignet als zentral gelegene Verletzungen. Der Einteilung nach Cooper (13) folgend liegen 60,7 % der Meniskusrisse im vaskulären Bereich, wovon ca. 30 % als prinzipiell nahtfähig eingestuft werden. Für andere Rupturen steht momentan nur die partielle bzw. subtotale Meniskektomie zur Verfügung.

Langzeitstudien zur Inzidenz von arthritischen Veränderungen im Kniegelenk nach totaler (27) und partieller (28) Meniskektomie zeigen, dass sich bei 36% bzw. 65 – 86 % der Patienten eine signifikante Gelenkspaltverschmälerung zeigt. Dies stimmt mit einer Vielzahl anderer klinischer (29-31) und tierexperimenteller (32) Studien überein. Bei einer partiellen Meniskektomie ergeben sich für die biomechanischen Verhältnisse im Kniegelenk stark erhöhte

Druckbelastungswerte auf den verbliebenen Gelenkknorpel. Dabei ist der Grad der Osteoarthrose direkt proportional zur Menge des entfernten Meniskusgewebes. In Studien (33,34) konnten Drucksteigerungen, selbst bei nur geringfügig entfernten Gewebemengen, um mehr als 350 % gezeigt werden.

Für die Meniskusnaht, die wie oben dargestellt allerdings nur in einer Minderzahl der Fälle einsetzbar ist, zeigen sich Arthroseraten im Bereich von 8 – 42 % (35).

Neben der Möglichkeit der Meniskusnaht als regenerative Methode gibt es auch Ansätze zum Ersatz von geschädigtem oder verloren gegangenen Meniskusgewebe. Dabei kann zur Rekonstruktion der Meniskusfunktion auf autogene und allogene Meniskustransplantate zurückgegriffen werden. Als autogene Transplantatquelle bietet sich der Kniefettkörper oder Ligamente des Patienten als fibröse Struktur an. Die Transplantate bildeten zwar eine meniskusähnliche Form aus, allerdings kein meniskusähnliches Ersatzgewebe und konnten folglich auch dessen Funktionen nicht ersetzen (36). Allogene Ersatzmaterialien sind besser untersucht, allerdings sind Langzeitdaten von mehr als 10 Jahren kaum verfügbar. Eine Vielzahl von kurz- oder mittelfristig angelegten Studien zeigt unterschiedliche Ergebnisse, wobei die Heilungs- bzw. klinischen Erfolgsquoten zwischen 13 % (37) und 87 % (38) angegeben werden. Darüber hinaus weisen allogene Transplantate das Risiko der Abstoßung in Folge einer Fremdkörperreaktion und die Gefahr der Schrumpfung, sowie fehlende Übereinstimmung in der Transplantatgröße auf.

Andere, Gewebe erhaltende Therapieverfahren zur Knorpeldefektreparatur wie zum Beispiel das Shaving (39), Mosaikplastiken (40), autologe Chondrozytentransplantation (41) oder subchondrale Abrasionsarthroplastik (42) erreichen zwar zumindest eine gewisse Defektfüllung, allerdings lediglich mit Ersatzgewebe, das biomechanisch minderwertig ist und die Arthrose zumeist nicht verhindern kann.

Diese unbefriedigenden Ergebnisse führten beim Thema Meniskusersatz in den letzten 15 Jahren zur Entwicklung resorbierbarer poröser Meniskus-Scaffolds (Trägermatrices) aus unterschiedlichen Materialien. Bei den meisten dieser zellfreien Transplantate wurde eine gute Biokompatibilität, Integration, Resorption und Regeneration festgestellt (43), von denen zwei mittlerweile für die klinische Anwendung zugelassen sind. Auf dem Weg zum vollwertigen Ersatz von Meniskusgewebe zeigte sich, dass primär auf Grund der fehlenden biomechanischen Belastbarkeit dieser Scaffolds ein optimaler Meniskusersatz noch nicht gefunden ist. Neben den passenden Scaffolds müssen auch entsprechende Wachstumsfaktoren und Zellen bestimmt werden, mit denen die Trägermatrix dann beimpft werden kann, um eine optimale Einheilung zu gewährleisten (44).

1.3 Entwicklung und Anwendungen von Tissue Engineering

Diese Forderungen scheinen tissue engineerte Gewebe grundsätzlich erfüllen zu können. Verfahren, in denen außerhalb des menschlichen Körpers (in vitro) Reparaturgewebe erzeugt wird (Tissue Engineering) sind in diesem Bereich äußerst viel versprechend. Dabei ist das Ziel (erkrankte) Gewebe zu heilen, zu „rekonstruieren“ oder in ihrer Funktion zu unterstützen. Die erste Definition von Tissue Engineering gab Skalak 1988: „Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“. Daraus ergaben sich die drei entscheidenden Einflussfaktoren für Tissue Engineering: das Zellmaterial, die entsprechenden Wachstumsfaktoren und die zelltragende Matrix. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ursprungsquellen für die Gewinnung von Chondrozyten

untersucht, bei gleichen Kulturbedingungen und ohne die (optionale) Trägermatrix. Das grundsätzlich chondrogene Potential beider Zelltypen wurde schon früh beschrieben, heute ist letztlich die Verbesserung Qualität und Verfeinerung der Versuchsabläufe ins Zentrum der Forschungsansätze gerückt.

Die grundsätzliche, medizinische Notwendigkeit einer Gewebe schonenden und erhaltenden Meniskustherapie ist erst in den letzten drei Jahrzehnten ins tiefere Bewusstsein der Forschung gerückt. Die grundlegenden Überlegungen wurden aber schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Roux und Benninghoff zu in vivo Differenzierungsprozessen im skelettalen Gewebe angestellt (45,46), die Pauwels später untersuchte (47). Er vermutete, dass eine Veränderung des Gewebevolumentums einerseits und eine Veränderung der Form andererseits die Differenzierungsabläufe vom mesenchymalen Ursprung bis zu fibrösem oder knorpeligem Gewebe steuern. Carter konnte im Tierversuch diese Vermutung schließlich mehr als 45 Jahre später bestätigen (48).

Die oben bereits erwähnte Notwendigkeit qualitativ gleichwertiges Meniskusersatzgewebe zur physiologischen Einheilung bereitzustellen, bedeutet im Idealfall morphologisch und funktionell gleichwertiges, vom originären Gewebe nicht zu unterscheidendes Gewebe zu erzeugen (49). Dabei wurde dem Vorbild der Natur folgend rasch klar, dass man biomechanisch hochwertiges Meniskusgewebe nur erhalten kann, wenn die Zellen entsprechend „vortrainiert“ werden, also in gewisser Art einer Belastung ausgesetzt würden, die den physiologischen Gegebenheiten im Kniegelenk entsprechen würden. Dieser „physiologische“ Bereich wurde in anderen Arbeiten auf 0,1-15 MPa und 0,05-1 Hz definiert (50,51). Von diesem Bereich abweichende Belastungen führen bei zu niedriger Intensität zu keiner Qualitätsverbesserung, bei zu hohen Intensitäten in Folge einer nachvollziehbaren Überbelastung zu arthritischen Veränderungen. Letztlich handelt es sich dabei also um die Reaktion der Einzelzelle auf externe Reize, also ihre Umwelt, und die daraus resultierenden

biologischen Regulationsprozesse. Dieser noch junge Bereich der Wissenschaft wird als Mechanobiologie beschrieben.

1.4 Überblick der mechanobiologischen Einsatzmöglichkeiten

Die erste Definition von Mechanobiologie lieferten Carter et al. 1998:

„Mechanobiology is the study of how mechanical or physical conditions regulate biological processes” (52).

Das die mechanische Belastung als Vorbehandlung von Zellen sich positiv auf deren chondrogenes Potential und die Gewebequalität auswirkt konnte in vielen Studien belegt werden (50,53-59).

In einem mehrzelligen Organismus interagiert jede Zelle sowohl mit anderen Zellen, als auch mit ihrer externen Umgebung, z.B. durch Zell-Zell-Kontakte, die Anhaftung an die Extrazellulärmatrix, ihre Zellrezeptoren und auch über mechanische Belastung und die dadurch innerhalb der Zelle resultierenden Deformationen. Keine Zelle ist also von ihrer Umgebung isoliert oder existiert in einem stressfreien Zustand. In der skelettalen Morphogenese stellt die mechanische Belastung einen der Haupteinflussparameter dar (60).

Daraus zog man den Schluss, dass es vorteilhaft sei, die Zellen in geeigneter Weise vorzubehandeln und es hat sich ein neuer Forschungszweig des Tissue Engineering, das so genannte Functional Tissue Engineering entwickelt. Hierbei ist das Prinzip die Verwendung von physikalischen Stimuli in der in vitro Kultur, um die Entstehung von biomechanisch hochwertigem Gewebe zu verbessern.

Für den Einsatz bei isolierten Chondrozyten, Tissue Engineertem Knorpelreparaturgewebe und Meniskuszellen wurde bereits eine Vielzahl an Belastungsformen experimentell erforscht. So z.B:

- Fluid Flow

- Zyklische mechanische Kompression
- Statische mechanische Kompression
- Hydrostischer Druck
- Zyklische Zugbelastung
- Hohe Scherbelastung und Niedrige Scherbelastung
- Perfusion
- Osmose

Und auch eher exotische Versuchsansätze mit simulierter, niedriger Schwerkraft, pulsierenden elektromagnetischen Feldern (PEMF) oder Nd:YAG Gepulstem Laserlicht (1064nm).

Allerdings ergaben alle innerhalb des physiologischen Belastungsbereichs durchgeführten Versuche einen positiven Einfluss auf die Chondrogenese.

Die besten Ergebnisse ließen sich dabei nicht mit einer einzelnen Belastungsform erzielen, sondern durch die Kombination verschiedener mechanischer Belastungsformen in so genannten Bioreaktoren (61). Nachteile von Bioreaktoren sind allerdings die entweder erhöhte Kontaminierungsgefahr des Materials oder der Verbleib der Proben über den gesamten Versuchsablauf im Reaktionsgefäß, d.h. sie sind einer Untersuchung innerhalb dieses entscheidenden Zeitraums nicht zugänglich. Momentan gibt es noch kein einheitliches Standardverfahren für die mechanobiologische Belastung von chondrogenem Zellmaterial, aber schließlich liegt darin ja gerade der Reiz und Ansporn wissenschaftlicher Arbeit.

1.5 Zusammenfassung und Zielsetzung der Arbeit

Für die Therapie von Meniskusdefekten im avaskulären Bereich stehen zum gegenwärtigen Zeitpunkt vielseitige Verfahren zur Verfügung, die allerdings in keinem Fall eine restitutio ad integrum ermöglichen und bei den etablierten

Verfahren der partiellen bzw. totalen Meniskektomie und der Meniskusnaht mit einem hohen Risiko einer postoperativ eintretenden Arthrose verbunden sind.

Durch Einsatz von Tissue Engineertem Knorpelreparaturgewebe könnte dieses Problem behoben werden, allerdings müssen zahlreiche Einflussfaktoren beachtet werden. Um ein natives Knorpel funktionell möglichst gleichwertiges Gewebe zu erhalten, bedarf es neben dem Einsatz von chondrogenen Zellen wie Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen und dem Zusatz entsprechender chondroinduktiver Wachstumsfaktoren auch mechanischer Beeinflussung. Zahlreiche Untersuchungen zeigten hierbei positive Effekte von Belastung auf die Extrazellulärmatrixbildung von Chondrozyten. Sehr wenig ist dagegen bis heute über die Auswirkungen mechanischer Belastungen auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen bekannt. Als der physiologischen Beanspruchung am ähnlichsten wird gemeinhin die hydrostatische Belastung angesehen.

Um eine für die Therapie von Meniskusläsionen im avaskulären Anteil langfristig Gewebe erhaltende Möglichkeit zu schaffen wurde Tissue Engineertes Knorpelreparaturgewebe als potentielle Lösung vorgeschlagen. Dazu bedarf es einerseits sinnvoller, reproduzierbarer Tiermodelle und andererseits geeignetem Zellmaterials. Durch hydrostatische Belastung konnte in humanen Systemen ein positiver Effekt auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und auch auf originäre Meniskuszellen nachgewiesen werden. Durch das Tiermodell am Kaninchen soll es möglich werden, die Daten beider Zelltypen innerhalb eines Individuums zu untersuchen. Die Fragestellungen die sich daraus ergeben sind Folgende:

Hypothese 1: Das Tiermodell am Kaninchen ermöglicht einen Vergleich der Chondrogeneseleistung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und originären Meniskuszellen, wodurch Erkenntnisse für die Humanforschung gewonnen werden können.

Hypothese 2: Mesenchymale Stammzellen von Kaninchen können durch Vorkultivierung und hydrostatische Belastung zu Fibrochondrozyten differenziert werden und sind damit potentiell für die Reparatur von Meniskusdefekten geeignet.

Hypothese 3: Die hydrostatische Belastung übt einen positiven Effekt auf die Chondrogeneseleistung sowohl von originären Meniskuszellen als auch von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark von Kaninchen aus. Das chondrogene Potential und die Qualität des Gewebes kann dadurch verbessert werden.

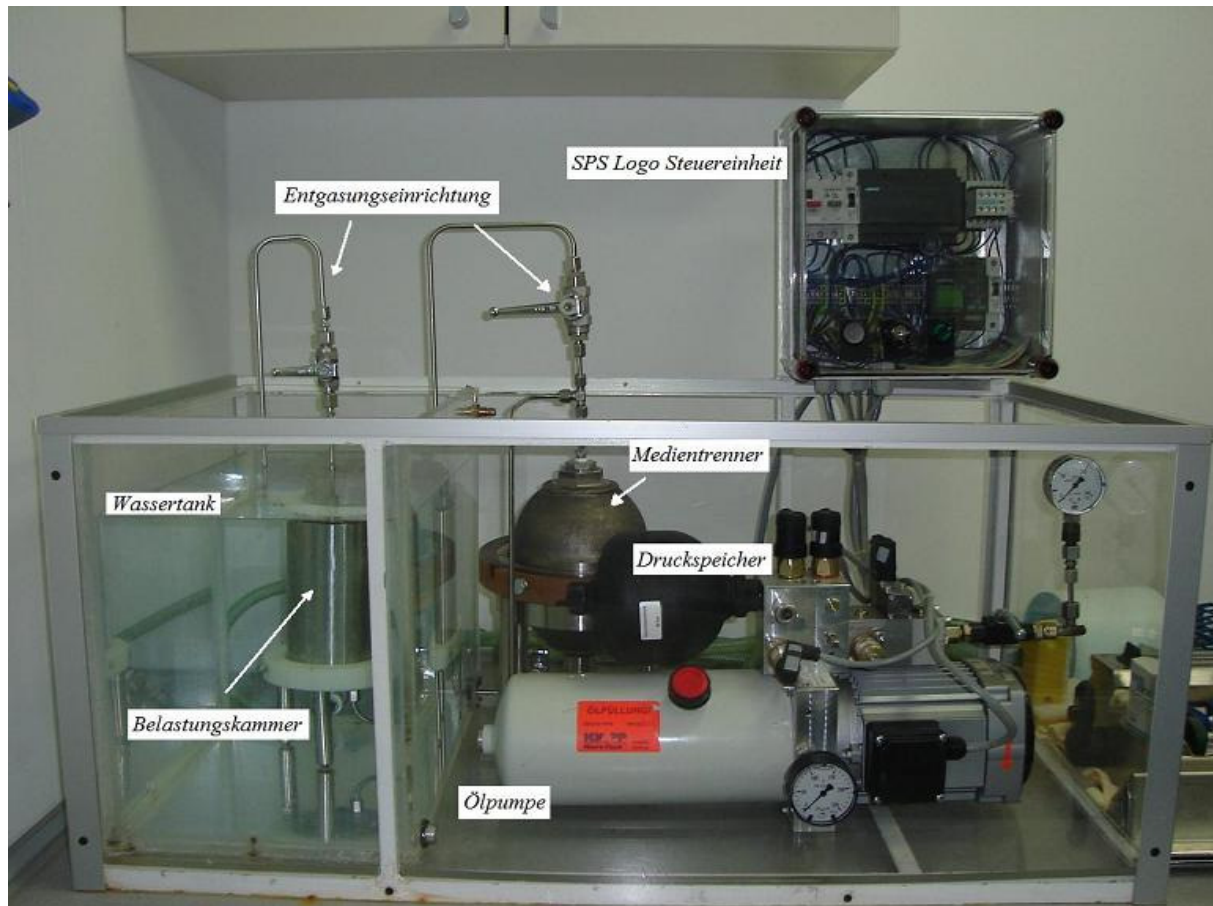
2. MATERIAL

2.1 Hydrostatische Druckapparatur

Um die Zellaggregate einer konstanten zyklischen hydrostatischem Druck zu unterziehen, die den physiologischen Reizen äquivalent ist, konnte auf eine vom Lehrstuhl Maschinenbau der Fachhochschule Regensburg entwickelte und in vorangegangenen Studien bereits erfolgreich getestete Apparatur zurückgegriffen werden (62).

Zur Erzeugung des hydrostatischen Drucks wird in der Apparatur mittels zweier getrennter Kammerkreisläufe Druck erzeugt, der in einem Druckspeicher zwischengespeichert werden kann. Eingebaute Manometer erlauben eine Kontrolle des angelegten Drucks zu jedem Zeitpunkt der Belastung. Die Übertragung des Drucks vom Öl- in den Wasserkreislauf wurde durch einen Medientrenner mit faserverstärkter Membran gewährleistet.

Um das System luftfrei zu halten stand eine Entgasungseinrichtung des Medientrenners und der Druckkammer zur Verfügung. Während der gesamten Belastungsphase wurde die Temperatur innerhalb des Systems über eine Heizspirale konstant bei 37°C gehalten.



Durch die Semi-Sterilität des Systems wurde es nötig zusätzlich Maßnahmen zur Keimfreiheit der Proben anzuwenden. Die zu belastenden Proben wurden steril und luftblasenfrei in eine Belastungskammer aus Glas überführt und mit einem Schraubverschluss, in dem sich eine teflonbeschichtete Membran befindet, verschlossen.



Zusätzlich wurden die Belastungskammern in sterile, mit PBS Puffer aufgefüllte Beutel eingeschweißt. Alle diese Arbeitsschritte erfolgten unter der sterilen Arbeitsbank. Erst danach wurden die Belastungskammern samt Aggregaten in die Druckkammer überführt.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

1,9-Dimethyl-Methylene blue	Sigma Aldrich, Steinheim
Antibiotic-Antimykotic	Gibco, Karlsruhe
Biobond Tissue Section adhesive	Polysciences, Eppenheim
D+Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dimethylaminoethanol	Serva, Heidelberg
Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylmethylenblau (DMMB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylene diamine tetra acid	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol	Roth, Karlsruhe
Hepes	Sigma Aldrich, Steinheim
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
ITS+3	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Percoll	Biochrom, Berlin
Percoll	Sigma Aldrich, Steinheim
TGF- β 1	R&D Systems, Wiesbaden
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
ToluidineBlue O	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA	Gibco, Karlsruhe

2.3 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Brutschrank CO2 Heracell 240	Heraeus, Hanau
Combitips plus 0,1/0,5/1/5/10/25/50 ml	Eppendorf, Hamburg
Microtom HM360 – Semidünnschnitt	Microm, Berlin
Mikroskope: Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Optical Tech	Optech, Toronto, Kanada
Fluovort FU	Leitz, Wetzlar
Axiotech Vario	Zeiss, Oberkochen
Leitz DMRD	Leitz, Wetzlar
Mikroskopkamera DMC 2	Polaroid, Offenbach
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Pipetten, Costar Stripette (1/5/10/25/50 ml)	Corning, Corning USA
Pipettensets (10/100/1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen epTips filter (10/100/250/1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenzentrifugenröhrchen	NeoLab, Heidelberg
Präzisionswaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen
	BioTek Kontron, Bad
Sicherheitswerkbank M18	Schulz Lufttechnik, Sprockhövel
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim

Vortex Genie 2	Diagnostic Instruments Inc, Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserbad WB 10	Memmert, Schwabach
Wheaton Shorty Vials	NeoLab, Heidelberg
Wheaton Schraubverschlüsse 15mm	NeoLab, Heidelberg
Wheaton Septen	
Teflon/Naturkautschuk	NeoLab, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugen: Combispin	Kisker-Biotech, Steinfurt
Multifuge 3S	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15ml/50ml)	Falcon, Heidelberg

2.4 Puffer und Lösungen

Toluidinblau	0,1g Toluidinblau in 100ml bidest.
Wasser	
DMMB Reagenzlösung	40 mM NaCl 40 mM Glycin 46 µM DMMB (pH 3,0)
MEFO	25ml 0,2M Phosphat- Puffer 25ml 37%ige Formaldehydlösung 50ml Methanol 100%
m-PBS- Puffer	(1M) 47,2g K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O + 6,6g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O + 36,0g NaCl mit a.d. auf 500g auffüllen pH zwischen 7,0 und 7,4
PBS	150mM NaCl

	8mM K ₂ HPO ₄
	2mM KH ₂ PO ₄
	(pH 7,3)
Trispuffer	0,2M 24,228g Tris
	1000ml aqua.dest. (pH 7)

2.5 Medien und Seren

Calf Serum Heat inactivated.	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	PAA, Cölbe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	PAA, Cölbe

Für Chondrozytenkulturen (CZ-Medium):

RPMI 1640 Medium

+10% Fetal Bovine Serum, +Hepes Puffer 1%, +PenStrep 1%

Für mesenchymale Stammzellkulturen (MSC-Medium):

Low Glucose DMEM (1000mg/l)

+10% Fetal Bovine Serum, +Hepes Puffer 1%, +PenStrep 1%

Chondrogenesemedium:

High Glucose DMEM (0,11g/l)

+1% Natrium- Pyruvat, ITS +3, +Dexamethason, TGFβ1 rekombinant,
Ascorbinsäure

2.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren

ITS+3 Sigma	Aldrich, Steinheim
Transforming Growth Factor-β1	R&D Systems, Wiesbaden
Ascorbinsäure:	0,0794g Ascorbinsäure, 20ml Tyrodes
Lsg, Dexamethason (Stock):	0,00392g Dexamethason, in 10ml 100% Ethanol
Dexamethason (Gebrauch):	200μl Stocklösung, 19,8ml <i>DMEM Low Glucose</i>

2.7 Medikamente

Atropionsulfat	Braun, Melsungen
Heparin	Liquemin, Roche, Grenzach-Wyhlen
Ketamin 10%	WDT, Garbsen
Pentobarbital	Narcoren, Merial, Hallbergmoos
Xylazin 2%	Serumwerk, Brenberg

2.8 Zellmaterial

Mesenchymale Stammzellen aus Kaninchen

Meniskuszellen (vaskulärer und avaskulärer Bereich) aus Kaninchen

2.9 Tiere

New Zealand White Rabbits Harlan und Winkelmann, Borcheln

(2,5 – 3,5 kg)

Die Tiere entstammen dem Tierstall des Universitätsklinikums Regensburg.

3. METHODEN

3.1 Zellgewinnung und zellbiologische Methoden

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und die Zellkulturen ansonsten in Kulturflaschen mit dem entsprechenden Medium (siehe 2.5) in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde in der Amplifikationsphase zweimal wöchentlich gewechselt.

3.1.1 Meniskuszellen

Die Meniskuszellen entstammen New Zealand White Rabbits (siehe 2.9), denen operativ die Menisken entfernt wurden. Dabei wurde sowohl vaskuläres als auch avaskuläres Gewebe entnommen. Nach Anästhesie der Kaninchen mit einer Mischung von 0,6 mg/kg KG Ketamin 10% (2,5ml) und Xylazin 2% (2,5ml) (siehe 2.7) mittels glutealer i.m. Injektion wurden die Tiere durch intravenöse Überdosierung von Pentobarbital getötet, anschließend in Rückenlage positioniert und das OP-Gebiet steril abgedeckt. Der Zugang erfolgte lateral, parapatellar als Längsinzision vom distalen Femurdrittel bis zur Tuberositas tibiae. Nach Eröffnung der Gelenkkapsel wurde der Hoffa-Fettkörper entfernt, das laterale Kollateralband disseziert und der Innenmeniskus entnommen. Zur Explantation des Außenmeniskus wurden zusätzlich die Patellarsehne, das Kollateral- und die Kreuzbänder durchtrennt. Das entnommene Gewebe wurde intraoperativ in serumfreiem RPMI-Medium gelagert und anschließend schnellstmöglich weiterverarbeitet, jedoch spätestens innerhalb von 24 Stunden bei zwischenzeitlicher Lagerung im Kühlschrank (4°C).

3.1.1.1 Zellgewinnung

Bei sterilen Arbeitsbedingungen unter der Sterilbank wurden die Menisken mechanisch in maximal 1 mm³ große Stücke mit dem Skalpell zerkleinert. Um ein Austrocknen zu vermeiden wurden die Gewebstücke weiterhin in RPMI-Medium gelagert.

Anschließend wurde das zerkleinerte Gewebe in serumfreies RPMI-Medium, das mit den Enzymen Kollagenase (Konzentration 1 mg/ml), Hyaluronidase (Konzentration 0,1 mg/ml) und Desoxyribonuclease (Konzentration 0,15 mg/ml), sowie 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, überführt und für 18 Stunden auf einer Heizplatte (\Rightarrow 37°C) auf einem Taumler enzymatisch dissoziiert.

Die Enzymreaktionen wurden durch die Zugabe von 20ml serumhaltigem RPMI-Medium gestoppt. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit 2000g (20°C; 5 Minuten) abzentrifugiert und das Zellpellet in 10ml RPMI-Medium resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde anschließend bestimmt (siehe 3.1.4).

3.1.1.2 Amplifikation

Das so gewonnene Zellmaterial wurde in Zellkulturflaschen ausgebracht, wobei auf 2×10^6 Zellen 15ml serumhaltiges RPMI-Medium kamen. Während der Amplifikationsdauer wurden die Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit) gelagert und das Medium dreimal wöchentlich gewechselt. Mit Erreichen einer 75% Konfluenz (entsprechend der Zellbedeckung der Kulturflaschenoberfläche) wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend konnten die nun inadhärenten Zellen aufgesplittet (im Verhältnis von max. 1:3) oder redifferenziert werden. Die Amplifikationsdauer eines Ansatzes betrug im Schnitt ca. vier bis sechs Wochen.

Zur Passagierung der Zellen auf weitere Kulturflaschen wurde das Kulturmedium entfernt, die Kulturflasche mit sterilem PBS Puffer gespült und

3ml Trypsin direkt auf die Zellen aufgebracht. Nach kurzer Einwirkzeit von max. einer Minute und zusätzlicher mechanischer Lockerung der adhäsiven Strukturen durch einen kleinen Stoß wurde die erfolgreiche Ablösung unter dem Mikroskop überprüft und die Trypsinreaktion zur Zugabe von 9ml serumhaltigem Medium geblockt. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert (5min, 2000g) und anschließend resuspendiert und nach Zugabe von 12ml (3ml Trypsin + 9ml Serum = 12ml; $12\text{ml} / 4 = 3\text{ml} \Rightarrow$ auffüllen mit 12ml auf gesamt 15ml) serumhaltigem RPMI-Medium im Verhältnis 1:3 auf neue Kulturflaschen ausgebracht.

3.1.1.3 Redifferenzierung

Redifferenzierung von amplifizierten Meniskuszellen bedeutet, dass die dedifferenzierten Zellen, welche gelenkknorpeluntypische Matrixbestandteile produzieren, in einem geeigneten Umgebungsmilieu die erneute Produktion von gelenkknorpelspezifischer extrazellulärer Matrix wiederaufnehmen.

Die Redifferenzierung der Zellen wurde nach dem oben beschriebenen Muster des Zellsplittings durchgeführt. Allerdings wurden nach der Zentrifugation die Zellen einem Vitalitätstest unterzogen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt (siehe 3.1.4).

Zur Redifferenzierung der Meniskuszellen wurden diese über Nacht für 18 Stunden bei einer Zellzahl von 200.000 Zellen pro Aggregat in 15ml Falconröhrchen in chondrogenes Nährmedium gegeben (siehe 2.5 \Rightarrow CZ-Medium).

3.1.2 Mesenchymale Stammzellen

Die verwendeten Stammzellen wurden denselben Kaninchen, denen auch die Menisken (siehe 3.1.1) entstammen, durch Beckenkammspunktion entnommen.

3.1.2.1 Zellgewinnung

Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark der New Zealand White Rabbits gewonnen. Dazu wurden die Kaninchen mit einer Mischung von 0,6 mg/kg KG Ketamin 10% (2,5ml) und Xylazin 2% (2,5ml) durch gluteale i.m. Injektion betäubt. In Bauchlage wurde nach sterilem Abdecken eine Hautinzision beidseitig von 1-2cm Länge im Bereich des Beckenkamms vorgenommen und anschließend der Knochen freipräpariert und dargestellt. Mit einer 16 gauge Nadel wurde die Knochenmarkshöhle punktiert und anschließend jeweils ca. 4ml Knochenmark mit einer heparinlösungsgefüllten Spritze entnommen. Danach wurde die Wunde mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Das intraoperativ erhaltene Knochenmark wurde direkt im Anschluss weiterverarbeitet. Dabei wurde auf eine Percoll Gradienten Trennung zu Gunsten der Vitalität der Zellen verzichtet. Nach Zugabe von chondrogenem Kulturmedium, das sich aus DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer zusammensetzt, wurde die Suspension bei 1700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer nach folgender Formel ermittelt.

$$N = Z * X * 10^4,$$

wobei Z die gezählte Zellzahl, X den Verdünnungsfaktor und die Zahl 10^4 den Kammerfaktor darstellen. Anschließend wurden auf eine 75 cm² Kulturflasche $2 * 10^6$ Zellen ausgebracht und mit 15ml mesenchymale Stammzellen-Medium (siehe 2.5 ⇒ MSC-Medium) versetzt.

3.1.2.2 Amplifikation

Kultivierung der Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit) bei Medienwechseln alle drei Tage.

Analog zum Vorgehen bei den Meniskuszellen werden die Zellen bei Erreichen einer etwa 75% Konfluenz (entsprechend der Zellbedeckung der Kulturflaschenoberfläche) zur Differenzierung weiterverarbeitet bzw. passagiert und auf neue Zellkulturflaschen im Verhältnis 3:1 ausgebracht (vgl. 3.1.1.2). Die Konfluenz wurde im Schnitt nach ca. vier Wochen erreicht.

3.1.2.3 Differenzierung

Eine chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen bedeutet, dass die adulten Stammzellen aus dem Knochenmark der Versuchstiere, in einem geeigneten Umgebungsmilieu die Produktion von gelenkknorpelspezifischer, extrazellulärer Matrix aufnehmen.

Bei der Differenzierung wurden die mesenchymalen Stammzellen ebenfalls (vgl. 3.1.1.3) über Nacht für 12 Stunden bei einer Zellzahl von 200.000 Zellen pro Aggregat in 15ml Falconröhrchen in chondrogenes Nährmedium gegeben (siehe 2.5 ⇒ Chondrogenesmedium).

3.1.3 Chondrogenesmodell

Für das zu Grunde gelegte Chondrogenesekulturmodell wurden die Zellen in den so genannten Aggregatzustand überführt und für insgesamt 28 Tage (inklusive sieben Tage Belastung) beobachtet. Dabei wurde in der anfänglichen einwöchigen Belastungsphase das Medium täglich, in der anschließenden dreiwöchigen Beobachtungsphase alle zwei Tage gewechselt. Zellaggregate

wurden an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 entnommen und später histologisch untersucht.

3.1.4 Lebendzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde nach der Zentrifugation (siehe 3.1.1.2) der konzentrierten Zellsuspension 50µl entnommen und 1:1 mit Trypanblau (0,05%) versetzt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, wohingegen lebende Zellen den Farbstoff nicht ins Zellinnere aufnehmen. Die prozentuale Bestimmung erfolgt nach kurzer Einwirkzeit im Mikroskop mit Hilfe einer Neubauerzählkammer. Die erzielte Zellzahl errechnet sich nach folgender Formel: $N = Z * X * 10^4$

wobei Z die gezählte Zellzahl, X den Verdünnungsfaktor, der sich aus dem Suspensionsvolumen (normalerweise 10ml) und der 2-fachen Verdünnung mit Trypanblau errechnet, und die Zahl 10^4 den „Kammerfaktor“ darstellen.

3.2 Hydrostatisches Belastungsverfahren

Nach Erreichen einer etwa 75% Konfluenz der Zellen wurden die Zellen vom Kulturflaschenboden durch Trypsin abgelöst, aufbereitet und jeweils 200.000 Zellen in Chondrogenesemedium überführt. Nach 12 Stunden konnten die Aggregate steril in die gläsernen Belastungskammern überführt werden. Anschließend wurden die Kammern mit Chondrogenesemedium aufgefüllt und luftblasenfrei durch einen Schraubdeckel mit integrierter Teflonmembran (siehe 2.1 und 2.3) verschlossen. Zur Reduzierung der Kontaminationsgefahr wurden die Belastungskammern zusätzlich steril und luftblasenfrei in mit PBS-Puffer gefüllte Plastikbeutel eingeschweißt. So vorbereitet wurden die Aggregate in die hydrostatische Druckapparatur eingebracht. Diese wurde mit 37°C warmen VE-Wasser gefüllt und nach Entgasung des Systems in Betrieb genommen. Dabei

wurden die Zellen für vier Stunden bei einer Frequenz von 1Hz und einem intermittierenden Druck zwischen 0,55 – 5 MPa zyklisch komprimiert. Der Belastungszeitraum betrug sieben direkt aufeinander folgende Tage. Über das inkompressible Medium und die Teflonmembran wird der Druck dabei direkt an die Aggregate ins Innere der Belastungskammer weitergegeben. Im Anschluss an die Belastungsphase wurden die Proben wieder entnommen und der Deckel der Kammer unter sterilen Bedingungen leicht geöffnet, um einen Gasaustausch im Brutschrank (37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit) zuzulassen. Am nächsten Tag wurde vor der erneuten Belastung das Medium gewechselt und das verbrauchte Medium zur späteren Auswertung aufbewahrt. Nach Ende der siebentägigen Belastungsphase wurden einige Aggregate zur Auswertung entnommen und bei -80°C gelagert. Die verbliebenen Proben wurden bei dreimal wöchentlichem Medienwechsel weiterkultiviert, um ausreichend Zeit zur weiteren Biosynthese und Differenzierung zu gewähren, und an den Tagen 14, 21 und 28 weitere Proben entnommen.

Für die anschließende Auswertung wurde den entnommen Proben jeweils eine unbelastete Kontrollprobe gegenübergestellt, die, wie die belasteten Proben auch, in Reaktionsgefäßen kultiviert wurden. Bei der Kontrollgruppe wurde in der Belastungsphase ebenfalls täglich und anschließend dreimal wöchentlich ein Medienwechsel durchgeführt und die Proben während der vierstündigen Belastung der Vergleichsgruppe aus dem Brutschrank genommen.

3.3 Histologische Methoden

Direkt nach der Entnahme der Aggregate am jeweiligen Versuchstag (0, 7, 14, 21, 28) wurden diese in MEFO (siehe 2.4) für 30 min. überführt und anschließend über eine Saccharosereihe entwässert. Die einzelnen Schritte erfolgten für alle Proben und Färbungen wie folgt:

- 10 min. spülen mit Methanol/Phosphaftpuffer (1:1)

- 30 min. spülen mit 0,1 M Phosphatpuffer
- 30 min. spülen mit 10% Saccharose
- 30 min. spülen mit 20% Saccharose
- 30 min. spülen mit 30% Saccharose
- spülen mit 40% Saccharose und bedecken der Proben mit einer dünnen oberflächlichen Schicht Tissue-Tek

Anschließend wurden die Proben im Kühlschrank gelagert bis sie am Ende der Versuchsreihe (entspricht d21) zusammen mit den zuletzt entnommen Proben weiter histologisch aufbereitet wurden.

3.3.1 Herstellung der Schnitte

Mit einem Kryostaten (Microm) wurden dann Gewebeschnitte von einer Schichtdicke von 12µm angefertigt und auf vorbeschichtete Adhäsivobjektträger aufgebracht. Nach zweimaligen vorsichtigem Waschen der Präparate in Aqua bidest. (zum Entfernen der Tissue-Tek Reste), wurden die Schnitte zur jeweiligen Färbung weiterbearbeitet.

Im Anschluss an die folgenden gewebespezifischen Färbungen (DMMA oder Toluidinblau) wurden die Präparate über eine Isopropanolreihe entwässert:

- 2x 5min. 70% Isopropanol p.A.
- 2x 5min. 80% Isopropanol p.A.
- 2x 5min. 90% Isopropanol p.A.
- 2x 5min. 95% Isopropanol p.A.
- 2x 5min. 100% Isopropanol p.A.
- 2x 5min. 100% Xylol

Daraufhin wurden die Schnitte mit DePex – Lösung luftdicht eingedeckt und zur späteren mikroskopischen Auswertung und Digitalisierung trocken aufbewahrt.

3.3.2 DMMB-Färbung

Diese Färbung führt zu einer violetten, metachromatischen Färbung der Extrazellulärmatrixbestandteile von Knorpelgewebe. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt.

- Die Präparate mit Aqua bidest. spülen
- Mit Farbstoffgebrauchslösung für DMMB-Färbung (siehe Material 2.4) überschichten
- Inkubation bei Zimmertemperatur für 3-5 Minuten
- Nach gründlichem Spülen in bidestiliertem Wasser werden die Färbeergebnisse mikroskopisch kontrolliert
- Eventuell nochmalige Färbung (visuelle Kontrolle)
- Nach Erreichen der gewünschten Farbeintensität Entwässerung der Präparate (siehe Punkt 3.3)

3.3.3 Toluidinblau Färbung

Die Toluidinblau-Färbung führt ebenfalls zu einer blauvioletten, metachromatischen Färbung der Extrazellulärmatrixbestandteile von Knorpelgewebe. Allerdings ist die Farbwirkung hier intensiver. Die Färbung wurde wie oben für die DMMB-Färbung bereits beschrieben durchgeführt, allerdings mit folgenden Änderungen.

- Die Farbstoffgebrauchslösung ist jetzt für Toluidinblau (siehe Material 2.4)
- Inkubation bei Zimmertemperatur für 10-15 Minuten
- Nur kurzes, vorsichtiges spülen mit 70% Isopropanol, da Toluidinblau sich darin rasch aus dem Präparat herauslöst

4. ERGEBNISSE

Für die Ergebnisanalyse wurden die Aggregate in Gruppen eingeteilt. Es wurde unterschieden in mesenchymale Stammzellen und Meniskuszellen (vaskulär–avaskulär), belastet–unbelastet und nach Untersuchungstag von Tag 0, 7, 14 bis 21.

4.1 Aggregatgröße

4.1.1 Fotoanalyse der Aggregatgröße

Die Aggregate wurden jeweils nach steriler Entnahme fotografiert und anschließend bzgl. ihrer Größe ausgewertet.

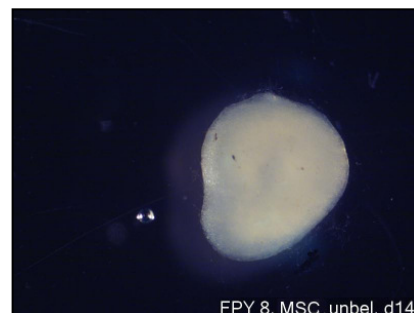
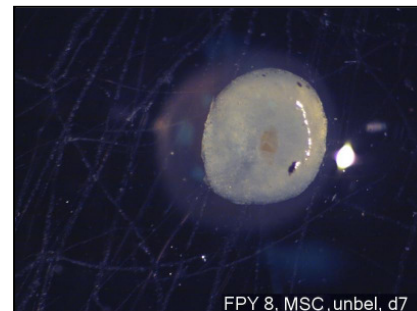
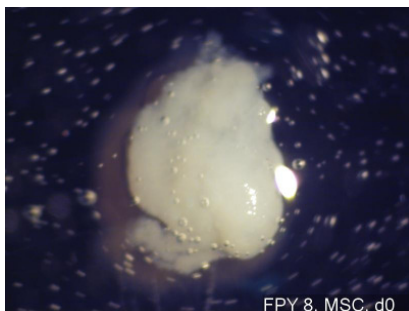


Abbildung 4-1:

Aggregatgrößenzunahme mesenchymale Stammzellen

unbelastet Tag 0, 7, 14

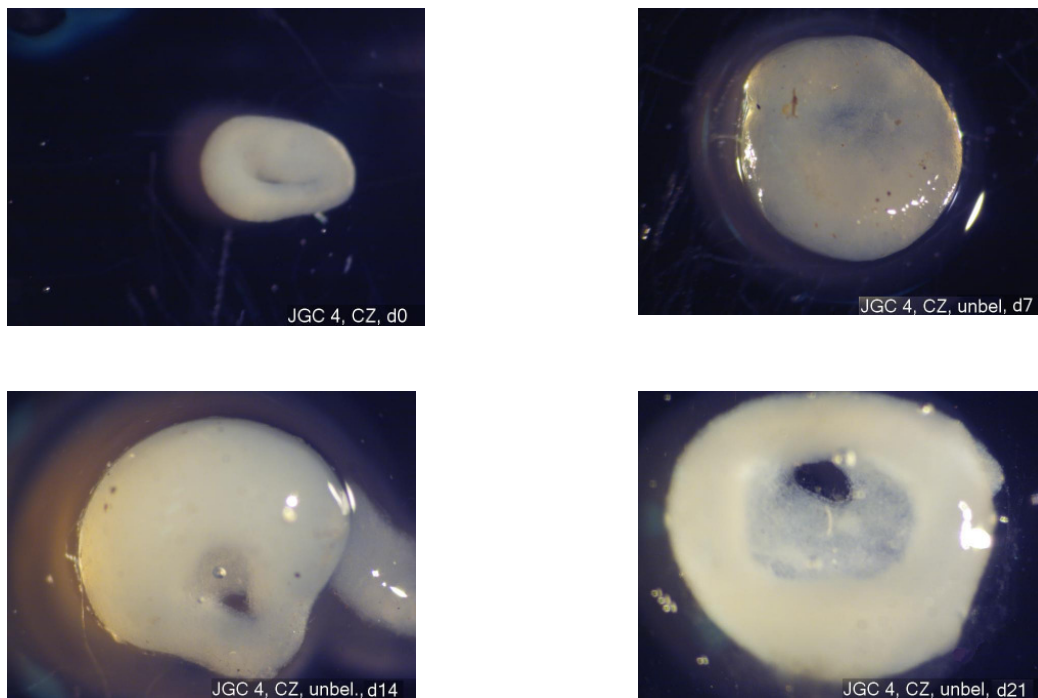


Abbildung 4-2:

Aggregatgrößenzunahme Meniskuszellen unbelastet Tag 0, 7, 14, 21

Bei den mesenchymalen Stammzellen zeigt sich ohne Belastung keine Größenzunahme, die Aggregate werden aber kompakter und erscheinen in ihrer Struktur dichter. Von Tag 21 liegt kein Bild vor, da sich im Zeitraum zwischen Tag 14 bis 21 eine Kontamination der Aggregate zeigte, die eine Auswertung unmöglich machte.

Es zeigt sich bei den unbelasteten Meniskuszellen eine deutliche Volumenzunahme, vor allem von Tag 7 auf Tag 14. Allerdings bleibt der zentrale Defekt bestehen, das Gewebe ist wenig stabil und nur locker miteinander vernetzt.

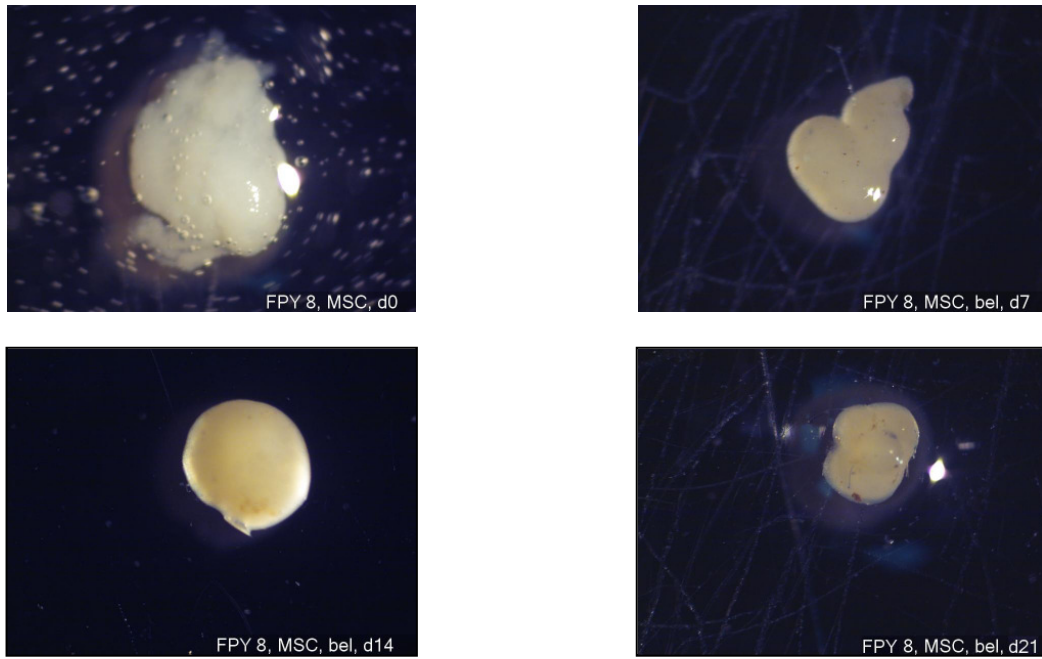


Abbildung 4-3:

Aggregatgrößenzunahme mesenchymale Stammzellen belastet Tag 0, 7, 14, 21

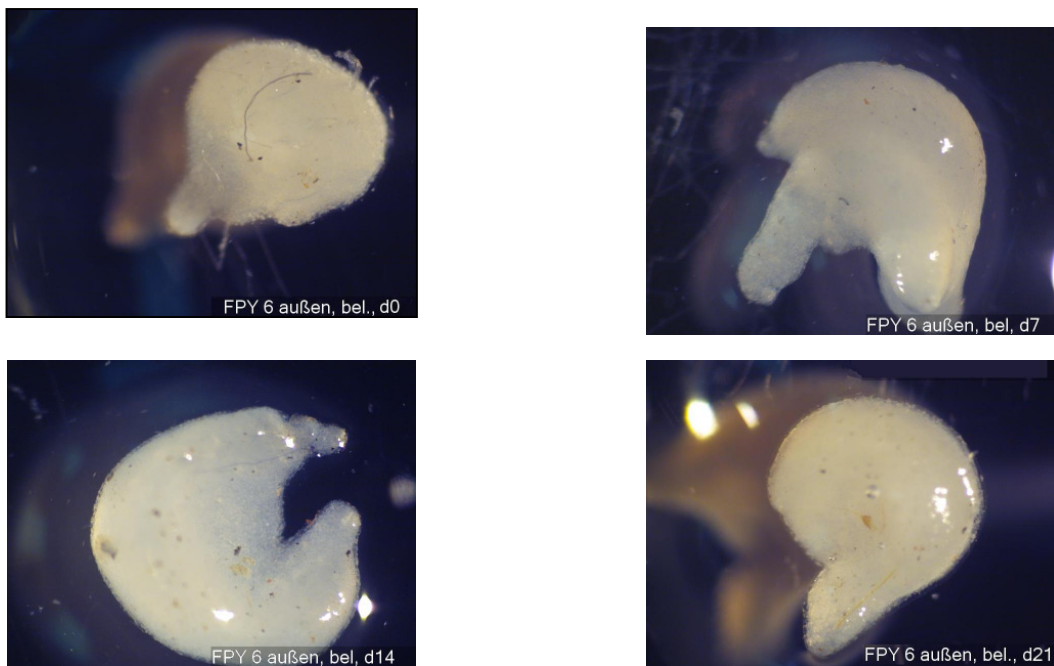


Abbildung 4-4:

Aggregatgrößenzunahme Meniskuszellen belastet Tag 0, 7, 14, 21

Bei den belasteten Meniskuszellen zeigt sich im Vergleich zu den unbelasteten keine bzw. nur eine geringe Größenzunahme. Das Gewebe ist allerdings deutlich fester und derber in seiner Struktur.

4.2 Histologische Färbung

4.2.1 DMMB-Färbung

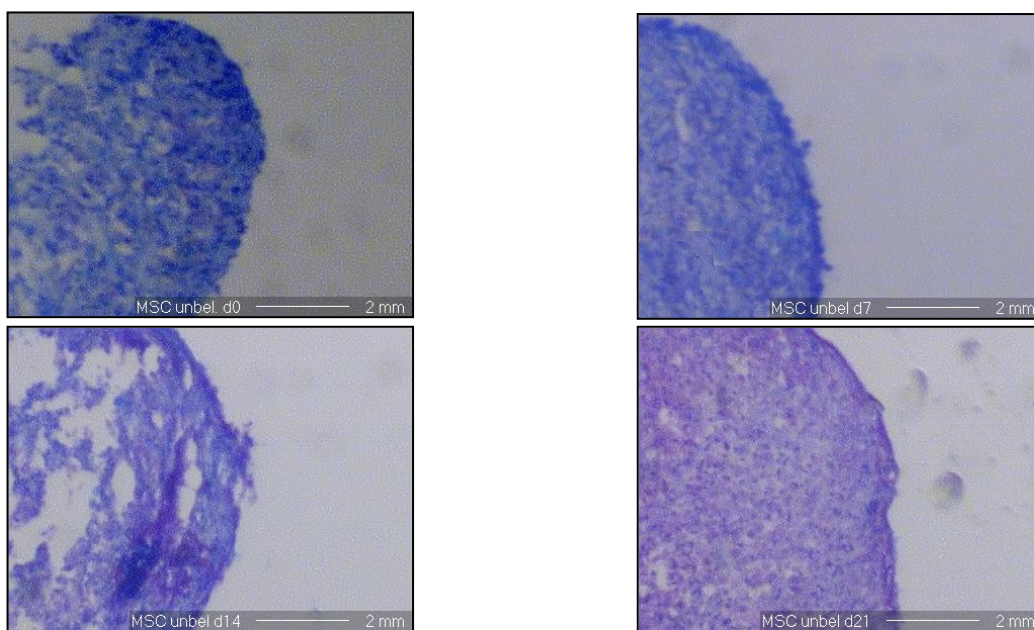


Abbildung 4-5:

DMMB-Färbung mesenchymale Stammzellen unbelastet Tag 0, 7, 14, 21

Es lässt sich bei den mesenchymalen Stammzellen eine geringe Chondrogenese in der DMMB-Färbung nachweisen. Eine deutliche Zunahme der extrazellulären metachromatischen Matrixablagerungen von Tag 14 auf Tag 21 zeigt die stattfindende Chondrogenese.

Die Daten sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

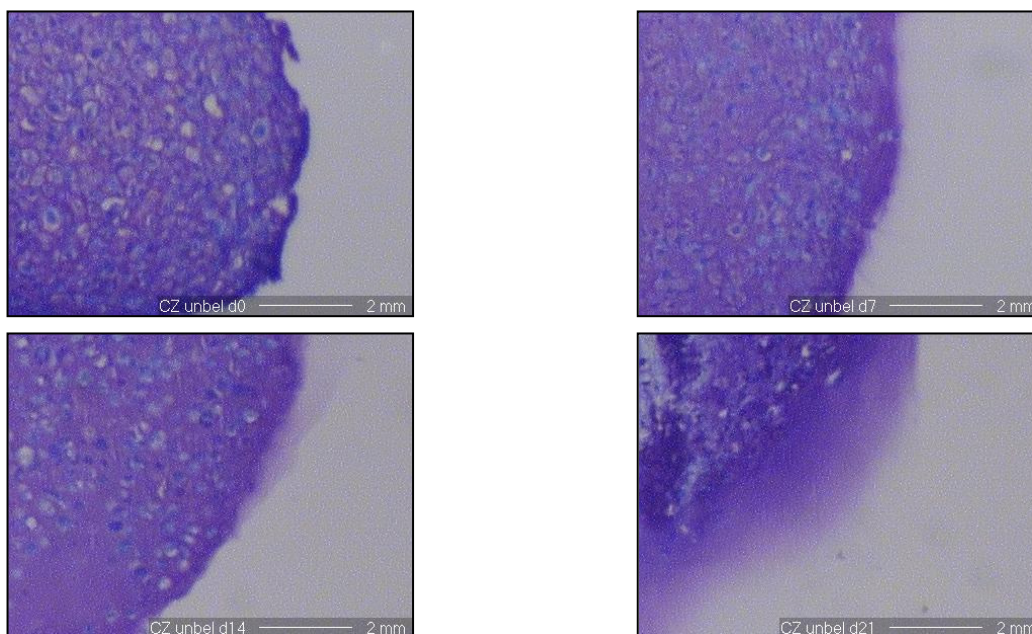


Abbildung 4-6:

DMMB-Färbung Meniskuszellen unbelastet Tag 0, 7, 14, 21

Die Meniskuszellen zeigen eine deutliche chondrogene Differenzierung, die sich von Tag 0 bis 21 noch intensivieren lässt.

Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

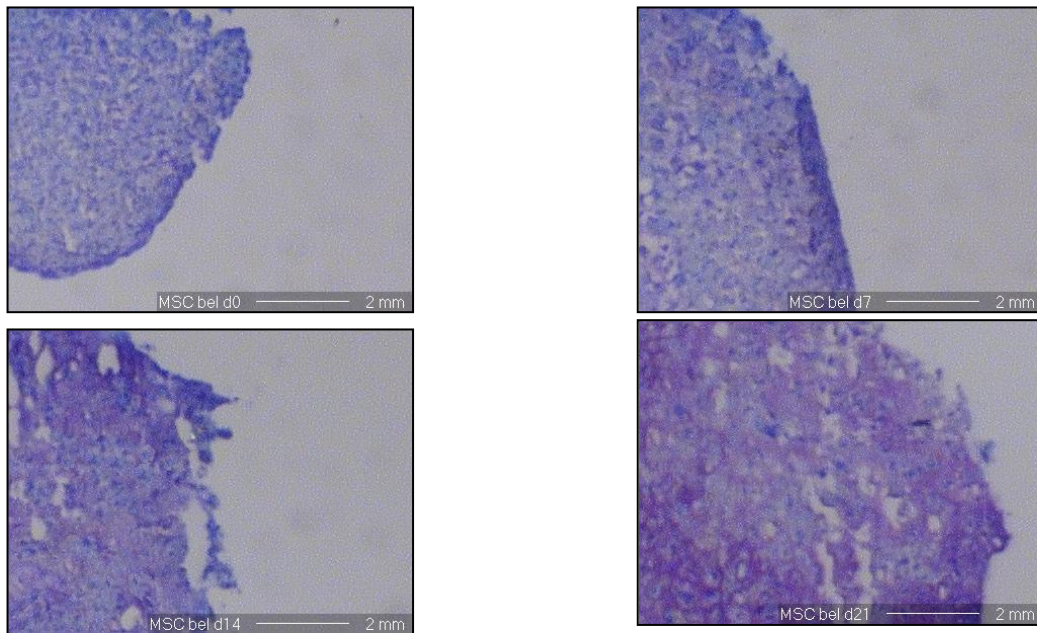


Abbildung 4-7:

DMMB-Färbung mesenchymale Stammzellen belastet Tag 0, 7, 14, 21

Unter Belastung lässt sich bei den mesenchymalen Stammzellen die Chondrogenese stärker induzieren. Eine extrazelluläre metachromatische Matrixablagerung zeigt sich bereits geringfügig ab Tag 14 und intensiviert sich bis Tag 21 nochmals.

Die Daten sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

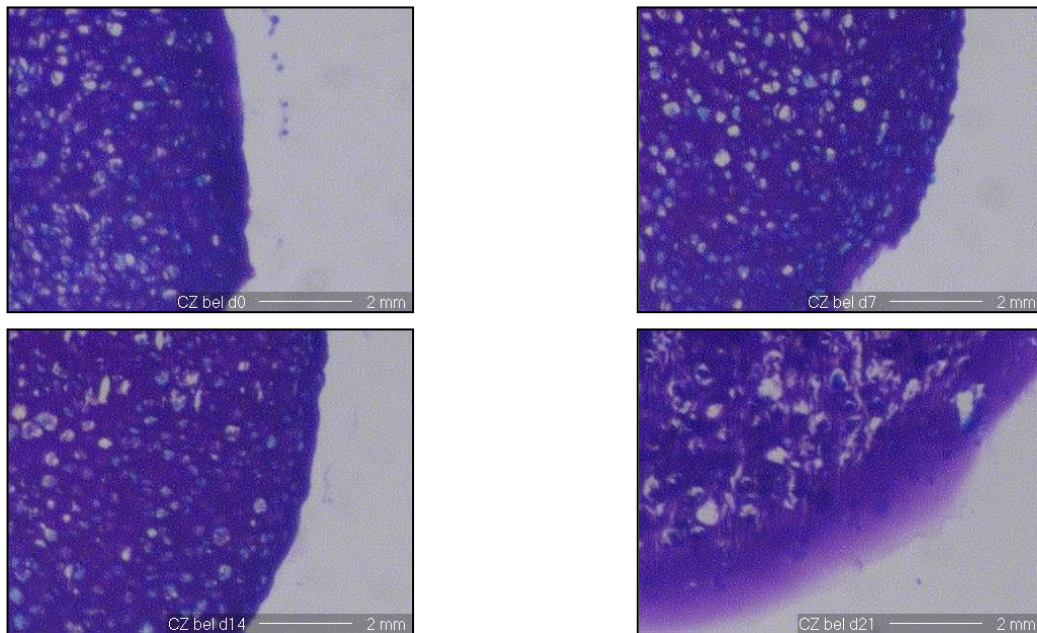


Abbildung 4-8:

DMMB-Färbung Meniskuszellen belastet Tag 0, 7, 14, 21

Es zeigt sich von Beginn an eine starke Chondrogeneseleistung der Meniskuszellen, die an Intensität zunimmt und im Vergleich zu den unbelasteten Zellen stärker ausgeprägt ist.

Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.2.2 Toluidinblau-Färbung

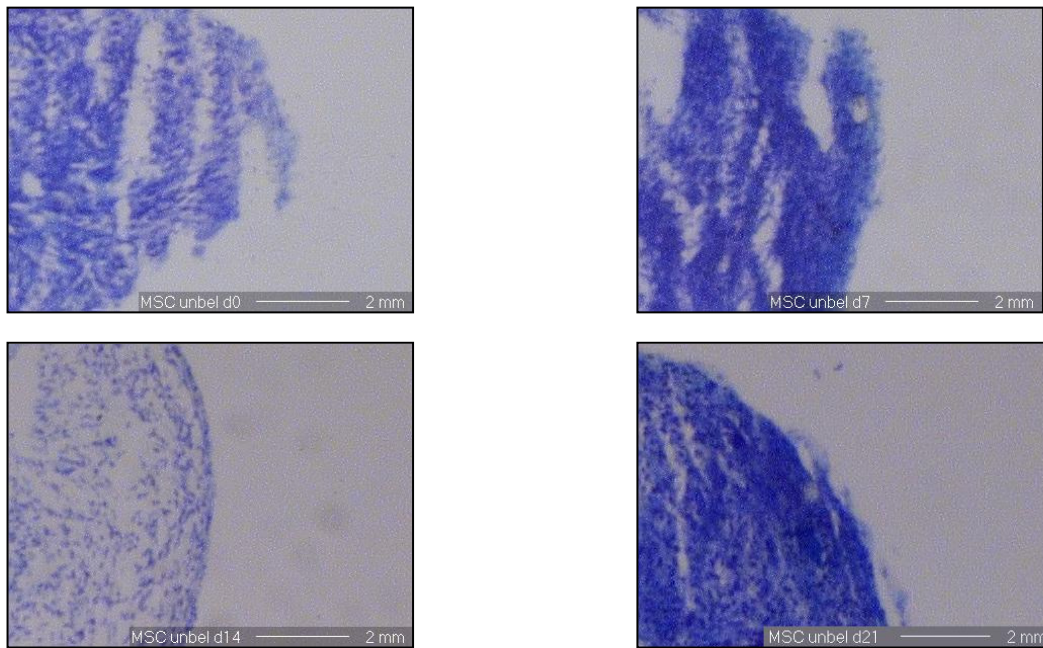


Abbildung 4-9:

Toluidinblau-Färbung mesenchymale Stammzellen unbelastet Tag 0, 7, 14, 21

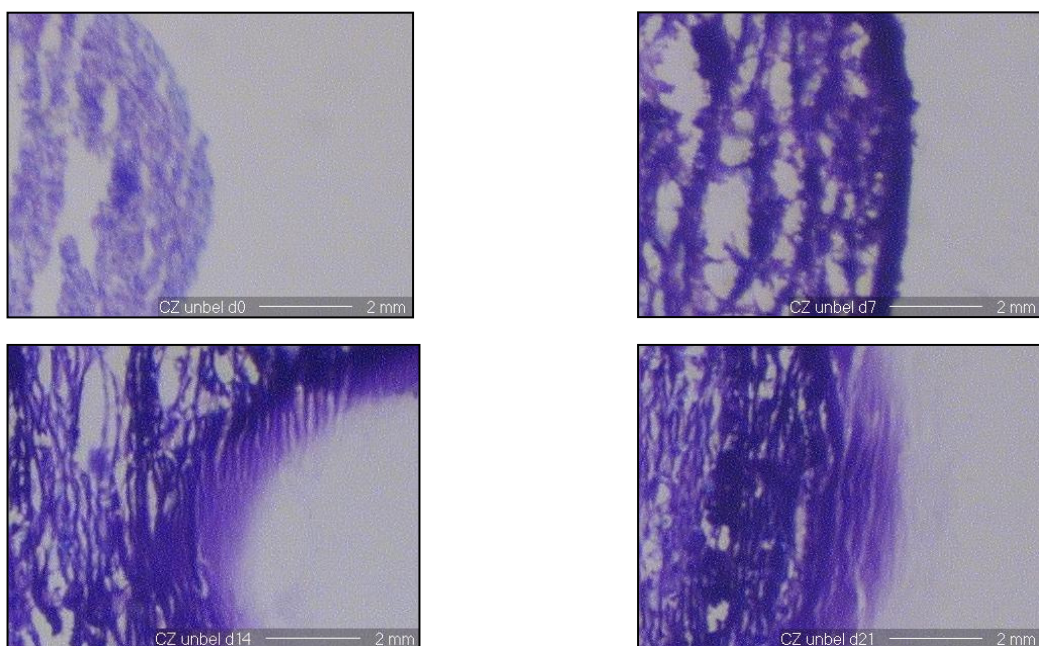


Abbildung 4-10:

Toluidinblau-Färbung Meniskuszellen unbelastet Tag 0, 7, 14, 21

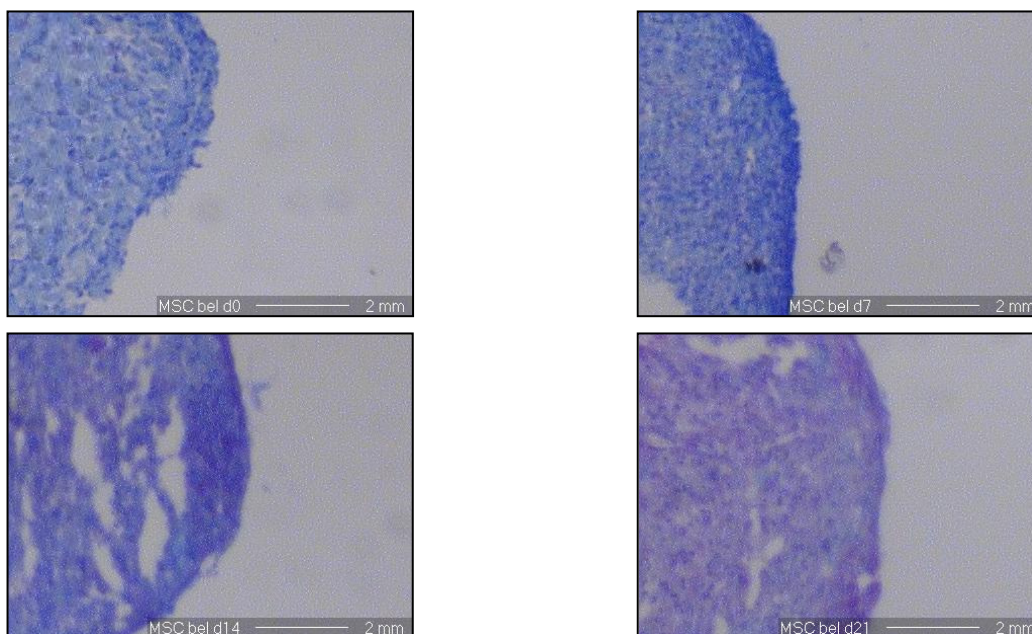


Abbildung 4-11:

Toluidinblau-Färbung mesenchymale Stammzellen belastet Tag 0, 7, 14, 21

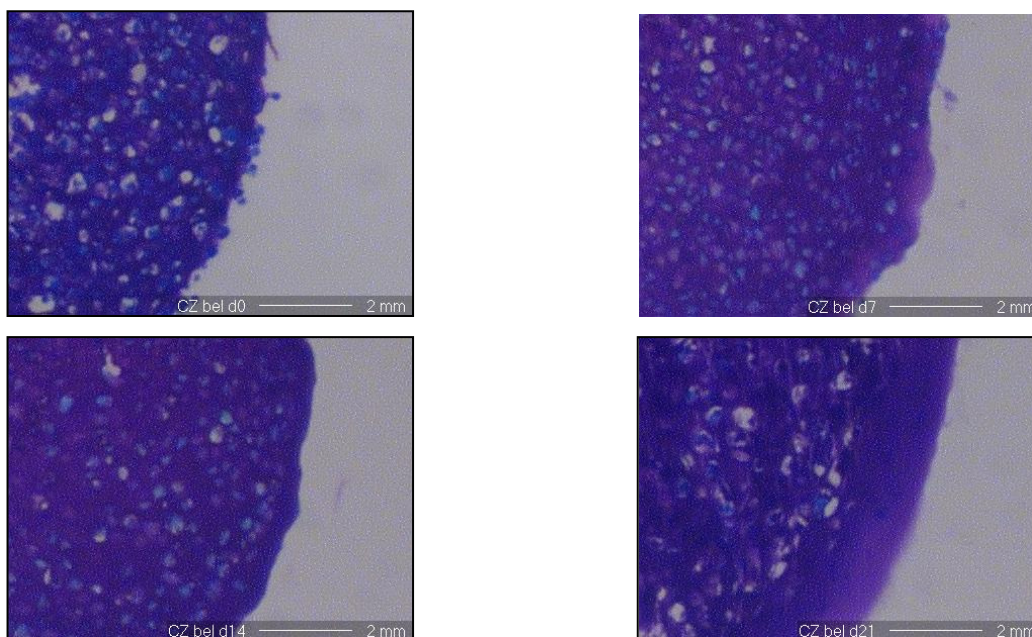


Abbildung 4-12:

Toluidinblau-Färbung Meniskuszellen belastet Tag 0, 7, 14, 21

Auch in der Toluidinblaufärbung zeigt sich das gleiche Bild, wie in der DMMB-Färbung: bei den Meniskuszellen läuft die Chondrogenese sehr gut ab und lässt sich sowohl mit Dauer der Nachkultivierung, als auch durch eine vorausgehende Belastungsphase intensivieren. Bei den mesenchymalen Stammzellen liegt die

Chondrogeneseleistung auf einem niedrigeren Niveau, es findet allerdings auch eine chondrogene Differenzierung statt, die durch eine vorangehende hydrostatische Belastung positiv beeinflusst wird.

Um eine negative Beeinflussung durch das Glas der Belastungsgefäße auszuschließen wurden die mesenchymalen Stammzellen über 21 Tage in Kultivierungsgefäßen (15ml Falcon Röhrchen) gehalten.

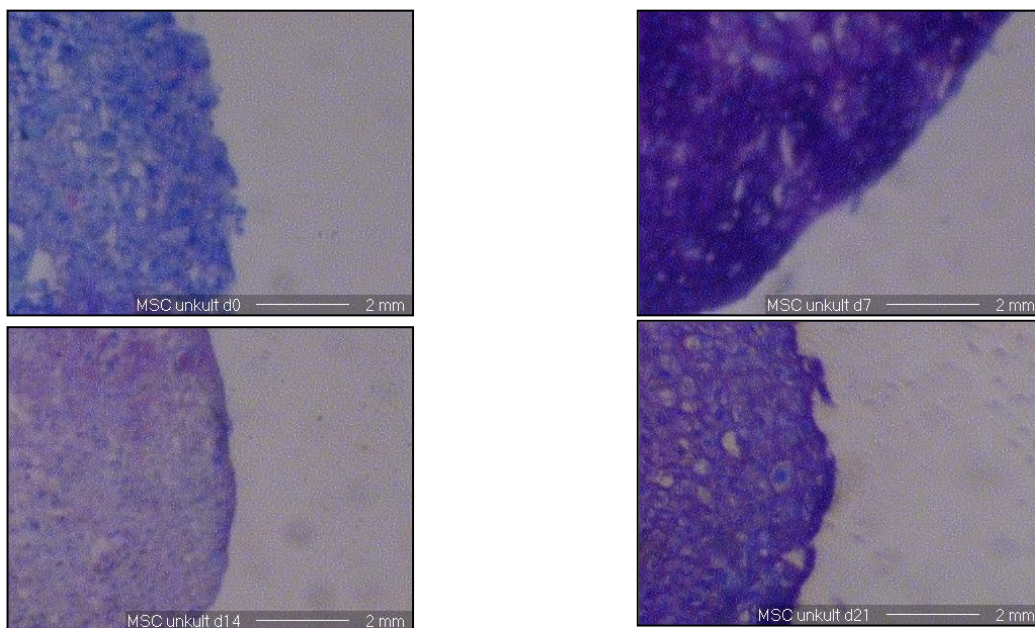


Abbildung 4-13:

Toluidinblau-Färbung mesenchymale Stammzellen unbelastet, nicht in Belastungsgefäßen kultiviert, Tag 0, 7, 14, 21

Die histologischen Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der Zellen, die während des Versuchs in den gläsernen Belastungsgefäßen kultiviert wurden.

Auch hier zeigte sich eine diskrete Chondrogenese ab Tag 14.

5. DISKUSSION

Mit der vorgestellten Arbeit wurden die Forschungen des Departments für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg im Bereich Tissue Engineering zur Optimierung von Meniskusgewebe weitergeführt. Ziel war es dabei das Potential von aus Kaninchen gewonnenen originären Meniskuszellen und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark mit und ohne hydrostatische Vorbelastung miteinander in ihrer Chondrogeneseleistung zu vergleichen. Das chondrogene Potential der mesenchymalen Stammzellen konnte bereits in zahlreichen früheren Versuchen im humanen System und auch im Kaninchensystem gezeigt werden (62-64).

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die in 1.5 aufgestellten Hypothesen wie folgt beantwortet werden:

Es zeigte sich, dass das Tiermodell am Kaninchen als screening-Methode zum Vergleich der Chondrogeneseleistung sehr gut geeignet ist und es lassen sich daraus Tendenzen für die Humanforschung gewinnen. In wie weit diese Daten letztlich auf das humane System übertragbar sind muss in weiteren Forschungsschritten geklärt werden.

Die Kombination von entsprechender Vorkonditionierung und hydrostatischer Belastung führt bei mesenchymalen Stammzellen zur Differenzierung in Fibrochondrozyten, die Chondrogeneseleistung von originären Meniskuszellen ist allerdings deutlich besser.

Für beide Zelltypen konnte ein eindeutig positiver Effekt der hydrostatischen Belastung auf das Chondrogeneseverhalten nachgewiesen werden.

Mesenchymale Stammzellen sind auch an der in vivo Reparatur von chondralen Defekten z.B. bei Frakturheilung oder bei artikulären Knorpelregeneration beteiligt. Deshalb wurden mesenchymale Stammzellen als mögliche Reparaturzellen für verschiedene Gewebsformen identifiziert. Vor allem ihrer Fähigkeit sich in eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellarten der mesenchymalen Zelllinie differenzieren zu können hat hierzu geführt (65-68).

Die Möglichkeiten der Therapie von Meniskusläsionen und die Rolle von synovialen Zellen zur Regeneration dabei wurden bereits früh erkannt und untersucht (69). Tissue Engineering bietet für den avaskulären Meniskusbereich, der einer gewebeerhaltenden Therapie bisher nicht zugänglich war, einen viel versprechenden Ansatz. Allerdings ist im Gegensatz zu anderen Geweben das Tissue Engineering von Meniskusgewebe deutlich weniger intensiv beforscht. Die in der Einleitung genannte erste Definition von Tissue Engineering nach Skalak wonach Tissue Engineering die Herstellung von Gewebe mit Hilfe einer Matrix (optional, im Versuch nicht verwendet), Zellen und geeigneten Wachstumsfaktoren umfasst, wird heute weiter gefasst. Nach NIH (National Institut of Health, USA) (70) kommen zu diesen Grundvoraussetzungen noch Engineering Design Aspects, Biomechanical Aspects of Design und Informatics to support tissue engineering. Nachfolgend werden die zwei Grundvoraussetzungen Zellen und Wachstumsfaktoren, sowie die durch die hydrostatische Belastung hinzukommenden Biomechanical Aspects of Design dargestellt.

Wachstumsfaktoren:

Für das Tissue Engineering von Meniskusgewebe wurde bereits eine Vielzahl von möglichen Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen getestet.

Als einer der meistverwendeten und potentesten Wachstumsfaktoren für Fibrochondrozyten hat sich dabei TGF- β erwiesen (71,72). Desweiteren wurde

ein positiver Einfluss von platelet derived growth factor (PDGF) und hepatocyte growth factor (HGF) auf Wachstum und DNA-Synthese von Fibrochondrozyten gefunden (73,74). Zusätzlich scheinen auf das Wachstum von Fibrochondrozyten BMP2, Insulin-like-growth-factor, Interleukin 1, epidermal growth factor, fibroplastic growth factor und platelet lysate wichtig zu sein. Allerdings ist der genau Wirkmechanismus und Ansatzpunkte der Wachstumsfaktoren derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht abschließend geklärt. Der entscheidende Anteil von TGF- β auf die in vitro Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen scheint hingegen gesichert (67) und gibt den entscheidenden Anstoß zur Differenzierung der Stammzellen in Chondrozyten. Im embryonalen Knorpel scheint TGF- β ebenfalls die chondrogene Differenzierung zu induzieren (75). Kongruent zu diesen Ergebnissen wurde im verwendeten Chondrogenesemedium ebenfalls TGF- β eingesetzt (siehe 2.5).

Zellen:

Die verwendeten Zellen stellen für das Tissue Engineering ebenfalls einen entscheidenden Faktor dar, weil sie sowohl über eigenes Reparaturpotential verfügen können, als auch für die biologische Akzeptanz des Spenders entscheidend sind. Aus diesem Grund erschien es zu Beginn der Forschung in diesem Bereich am naheliegendsten, originäre Meniskuszellen zu verwenden (76-80). Allerdings konnte damit kein homogenes Gewebe erzeugt werden, das einheitliche biologische Eigenschaften gehabt hätte.

Weitere mögliche Orte für die Zellgewinnung waren Chondrozyten aus dem hyaline Gelenkknorpel, die allerdings wie die originären Meniskuszellen den Nachteil der eingeschränkten Verfügbarkeit haben.

Eine relativ leicht zugängliche, gut verfügbare und deshalb geeignetere Quelle stellt das Knochenmark als Möglichkeit der Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen dar. Außerdem haben sie den Vorteil, dass ihr

Differenzierungspotential noch sehr hoch ist. So konnte für das Differenzierungsvermögen mesenchymaler Stammzellen aus dem Meniskus gezeigt werden, dass dies vom Entnahmeort abhängig ist, also regional unterschiedlich ist (81). Durch andere Tissue Engineering Verfahren ist heute bereits die Anzucht von vielen anderen Gewebearten, wie z.B. Knochen, Gelenkknorpel, Fett, Gefäße und mittlerweile auch partiell die Anzucht von Zahnorganen (11) möglich. In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Heilung von künstlich herbeigeführte Defekte im avaskulären Meniskusbereich von Kaninchen mit Knochenmark und Fibrin-Gewebekleber im Vergleich zu nur mit Fibrin-Gewebekleber versorgten Defekten signifikant besser war (82), was die Arbeitsgruppe auf die enthaltenen pluripotenten Zellen zurückführte.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei aus Knochenmark stammenden mesenchymalen Stammzellen keine Chondrogenese erzielt, wohingegen die Chondrogeneseleistung von originären Meniskuszellen erwartungsgemäß und anderen Forschungsberichten entsprechend als äußerst positiv zu beurteilen war. Die Gründe hierfür werden weiter unten diskutiert.

Biomechanical Aspects of Design:

Die prinzipielle Funktionsfähigkeit und Effektivität der speziell konstruierten hydrostatischen Druckapparatur wurde ebenfalls bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (83,84).

Die physiologisch ablaufenden Mechanismen bei der skelettalen und chondrogenen Reparatur und Entwicklung wird das Gewebe einer Vielzahl an mechanischen Belastungen ausgesetzt, die für die Qualität des entstehenden Gewebes von großer Bedeutung sind. Im Gelenkknorpel selbst wirken in vivo neben Scherkräften hauptsächlich zwei Arten von Druckbelastungen, eine kompressive und eine hydrostatische Belastung. In der superfiziellen Zone des Knorpels kommt es durch die Kompression zu einem Ausstrom interstitieller

Flüssigkeit in den Gelenkspalt. In den tiefer gelegenen Schichten findet hingegen kein Fluss mehr statt, hier wird hydrostatischer Druck aufgebaut und direkt an den subchondralen Knochen weitergegeben (85). Alle diese Belastungsformen sind heute in vitro simuliert werden. Die zur Verfügung stehende hydrostatische Belastungsmaschine erfüllt dabei die ideale Voraussetzung einer allseits gleichmäßigen Belastung auf die Aggregate.

Ex Vivo Compressive Loading Conditions

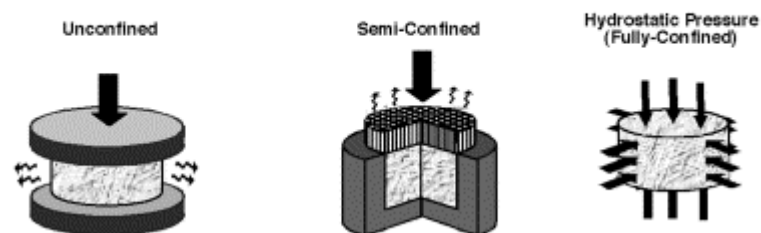


Abbildung 5-1:

Drei Formen der ex vivo Belastung [nach (85)]

Der positive Effekt allgemein biomechanischer Belastung (z.B. mechanisch, hydrostatisch, osmotisch, Scherkraft, Ultraschall) auf die chondrogene Differenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten wurde in der Literatur bereits frühzeitig und vielfach beschrieben (50,53-57,59,86). Dabei wurde festgestellt, dass die mechanische Belastung generell einer der einflussreichsten extrazellulären Parameter ist (87) und bei den Chondrozyten sowohl biosynthetische, als auch katabolische Aktivitäten beeinflusst (88). So geht aus (89) hervor, dass isolierte Chondrozyten auf mechanische Belastung mit einer Erhöhung der mRNA-Expression von Kollagen, Aggrecan und anderen Matrixmolekülen reagieren. Aus den in Abbildung 5-1 dargestellten drei verschiedenen Belastungsarten ergeben sich unterschiedliche Belastungsintensitäten, -richtungen und -formen. Bei der Semi-Confined Compression sind Boden und Seiten der Gewebekammer undurchlässig und die Aggregate werden mit einer porösen Platte belastet. Dabei kommt es zu

einer Deformation des eingespannten Gewebes, was eine intensive Ionendiffusion und einen in axialer Belastungsrichtung gerichteten Fluid Flow zur Folge hat (90,91). Dabei werden allerdings die in vivo vorkommenden Belastungsintensitäten nur selten erreicht. Bei der Belastungsform der Unconfined Compression wird das Gewebe von oben und unten durch zwei entweder undurchlässige (58,92) oder durchlässige (90,91,93) Platten belastet. Bei der dritten Belastungsform, dem hydrostatischen Druck, wird das gesamte Gewebe von allen Seiten über die im Gewebe eingeschlossene Flüssigkeit gleichmäßig belastet und es kommt zu keiner Deformation des Gewebes. Die verwendete hydrostatische Druckapparatur schafft genau diese Voraussetzungen. Durch Übertragung des Drucks zunächst von der Membran des Medientrenners auf die Flüssigkeit in der Druckkammer und von dort über die teflonbeschichtete Membran (dem Septum) der Belastungsgefäße direkt auf die Aggregate konnte eine gleichmäßige, allseitige Belastung sichergestellt werden.

Biologische Reaktionen auf hydrostatischen Druck sind in vielfacher Weise bekannt (94). Dabei spielen die Dauer und die Intensität der hydrostatischen Belastung eine entscheidende Rolle. Bei physiologischer Frequenz und physiologischem Ausmaß ist zyklischer, hydrostatischer Druck in der Lage zahlreiche für die Chondrogenese förderliche Effekte hervorzubringen und andererseits auch hemmende Faktoren in ihrer Expression zu senken. So werden z.B. die Proteoglykansynthese (95,96), Kollagen Typ II und Aggrecan mRNA Expression (51,97,98), die Proteinproduktion (51,96,99) sowie die TGF- β Konzentration (95,100) erhöht, während hemmende Einflüsse wie die Konzentration von Matrixmetalloproteinen (MMP-2) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, MCP-1) (51,57,100), sowie die NO Freisetzung und die NOS Expression (98,101) verringert werden. Allerdings führen unphysiologisch hohe Drücke wiederum negative Effekte mit sich führen, wie eine Inhibition der Proteoglykansynthese, die Steigerung der Expression von Heat Shock Protein-

70 (100,102). Ebenso wurden unphysiologische Veränderungen im Golgiapparat und am Zytoskelett gefunden (103,104). Auch histologisch konnten die positiven Einflüsse auf das Chondrogeneseverhalten und die Gewebequalität von mesenchymalen Stammzellen und kultivierten Meniskuszellen bereits vielfach nachgewiesen werden (85,105-107).

Als ideale Belastungsparameter wurde daher ein Belastungsfenster von 0,1-15 MPa und 0,05-1 Hz gefunden (50,108). Die Versuchsparameter mit einem intermittierenden Druck von 0,55-5 MPa bei 1 Hz bei einer siebentägigen Belastung von je vier Stunden sind so gewählt, dass sie diesem Belastungsfenster entsprechen.

An Hand von autologen Chondrozyten aus Schafen, Hunden und Menschen konnte gezeigt werden, dass Ergebnisse von einem Tiermodell auf das andere bzw. auf den Menschen nicht grundsätzlich übertragbar sind (109), es ergeben sich allerdings richtungsweisende Resultate für die Humanforschung, da die Ausprägung der Ergebnisse zwar unterschiedlich sind, Tendenzen aber übertragbar bleiben. Deshalb hat sich gerade in der vorliegenden Arbeit das Kaninchen-System als äußerst Erfolgs versprechend und übersichtlich gezeigt. Durch die einfachen OPs zum Erhalt der Meniskus- und Stammzellen und das großzügig vorhandene Meniskusmaterial eignet sich dieses Modell besonders als screening-Methode zur Grundlagenforschung auf experimentellem Level.

Die Auswertung erfolgte in der vorliegenden Arbeit nur histologisch (siehe 4.2). Ein positiver Effekt der hydrostatischen Belastung ist dabei an Hand einer intensiveren metachromatischen Färbung der Extrazellulärsubstanz (bei DMMB und Toluidinblau) in den belasteten Gruppen ersichtlich. Dieser Effekt lies sich in allen kultivierten Meniskuszellgruppen nachweisen und war bei allen unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten erkennbar. Diese Ergebnisse lassen sich also gut in die aus den oben angegebenen Literaturangaben einordnen.

Für die mesenchymalen Stammzellen zeigte sich eine geringere Chondrogeneseleistung im Vergleich zu den Meniskuszellen. In zwei aktuell erschienen Studien werden für mesenchymale Stammzellen aus Kaninchen synoviale Zellen gegenüber aus dem Knochenmark entnommenen allerdings positiver in ihrem Chondrogenesepotential bewertet (110) bzw. im Experiment bevorzugt (111). In der Arbeit zeigte sich, dass die Chondrogeneseleistung bei mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu den Meniskuszellen geringer ausfällt. Da das prinzipielle Chondrogenesepotential von mesenchymalen

Stammzellen aus Kaninchenknochenmark bereits gezeigt werden konnte (64) stellt als mögliche Komplikation der Vorgang der hydrostatischen Belastung natürlich einen potentiell Einfluss nehmenden Parameter dar, wobei allerdings auch unbelasteten Kontrollgruppen eine geringere Chondrogenese zeigten. Allerdings wurden sie entsprechend dem Versuchsdesign unter identischen Konditionen kultiviert und ebenfalls in die Belastungsglasgefäße überführt.

Deshalb wurde der Versuch insgesamt sechs Mal mit jeweiliger Abänderung einer der folgenden Parameter durchgeführt: Wiederholung des ursprünglichen Versuchs, kein Splitting der vorkultivierten Zellen während der Amplifikationsphase, Verwendung von Zellmaterial aus jüngeren Donorkaninchen (max. Alter 1 Jahr), vorsichtigeres Aufbereiten des operativ gewonnenen Stammzellmaterials durch nur einmalige Zentrifugation und anschließend direkter Überführung in die Kulturflaschen, längere Differenzierungsphase (bis max. 48h) und belassen der unbelasteten Proben in Kultivierungsgefäßen. Das Ergebnis ließ sich durch all die ersten fünf Maßnahmen nicht histologisch erkennbar beeinflussen: die Meniskusgruppen brachten immer hervorragende Chondrogeneseleistung, sowohl ohne und noch intensiviert mit hydrostatischer Belastung hervor, während in der Gruppe der mesenchymalen Stammzellen die Chondrogeneseleistung stets geringer ausfiel, wobei auch hier die hydrostatische Belastung einen positiven Effekt hatte. Ein Belassen der differenzierten Stammzellen in Kultivierungsgefäßen führte ebenso

zu einer nachweisbaren Chondrogenese, womit ein Einfluss der gläsernen Belastungsgefäße ausgeschlossen werden konnte.

Eine Wiederholung des ersten Versuchsdurchlaufs zum Ausschluss möglicher unerkannter Verunreinigung, Kontamination oder Ähnlichem brachte ein identisches Ergebnis hervor.

Ein Splitten der Zellen während der Amplifikationsphase (siehe 3.1.2.2) ermöglicht es geringere Mengen an Zellmaterial zu entnehmen bzw. mit einer größeren

Zellzahl das Experiment durchzuführen. Allerdings wird bei diesem Vorgang eine (tolerierbare) kurzzeitige Schädigung der Zellen durch das zugegebene Trypsin vermutet. Es ist an sich ein zellbiologische anerkanntes Verfahren wurde aber bei einem Versuchsdurchlauf als mögliche Ursache für die ausbleibende Chondrogenese in der Gruppe der mesenchymalen Stammzellen unterlassen. Allerdings konnte an anderen Tiermodellen gezeigt werden, dass mit häufigem Passagieren der Zellen das chondrogene Potential sinkt (109).

Dass das Alter der Donortiere eine entscheidende Rolle für das Differenzierungspotential, die Konzentration und die Qualität der gewonnenen pluripotenten Zellen konnte von Huibregtse (112) gezeigt werden.

Die Aufbereitung des intraoperativ gewonnen Knochenmarks erfolgte nach dem unter 3.1.2.1 beschriebenen Protokoll. Dabei wurde bereits auf die Percoll Gradienten Trennung zu Gunsten der Vitalität der Zellen verzichtet. In einem Versuchsdurchlauf wurde ein besonderes Augenmerk auf den sorgsam Umgang mit den gewonnenen Knochenmarkszellen gelegt, d.h. die Zentrifugationskräfte wurden auf 850 rpm halbiert und vorsichtigst resuspendiert und auf die Kulturflaschen ausgebracht. Auch dabei handelt es sich im Grunde um biotechnologisch anerkannte und vielfach verwendete Verfahren.

Eine verlängerte Differenzierungsdauer auf bis zu 48 Stunden im Gegensatz zu den im ursprünglichen Versuchsprotokoll veranschlagten 12 Stunden sollte den Zellen die Möglichkeit zur ausreichenden Differenzierungszeit bis zum Beginn der Belastungsphase mit entsprechend einsetzendem Zellstress geben. Dabei konnte zwar festgestellt werden, dass die Aggregate eine größere Festigkeit und Stabilität und dadurch ein verbessertes Handling erreichten, allerdings hatte dies ebenfalls keinen Einfluss auf die Chondrogeneseleistung der Zellen.

Als letzte Möglichkeit wurde die hohe Proteinbindungsfähigkeit von Glas als mögliche Ursache untersucht. Die Haftung erfolgt dabei nicht kovalent, sondern über intermolekulare Wechselwirkungen, die sich zu ca. 80% in Wasserstoffbrückenbindungen, 15% elektrostatische Wechselwirkungen und zu 5% in sonstige Bindungskräfte aufteilen (113). Diese Eigenschaft wird mittlerweile versucht zur Bindung spezifischer Moleküle zu nutzen (114). Dazu wurde auf eine identische Lagerung der nicht belasteten Aggregate verzichtet und sie stattdessen in einem 15ml Falconröhrchen, in dem sie normal nur während der Redifferenzierungsphase für 12 Stunden gehalten werden. Das bedeutet, dass die unbelasteten mesenchymalen Stammzellen nicht in den Belastungsglaskammern während der Belastungsphase kultiviert wurden. Damit konnte eine mögliche übermäßig hohe Proteinbindung und Chondrogenese hemmende Beeinflussung durch das Glas der Belastungskammern ausgeschlossen werden. Es könnte am Ende der Differenzierungsphase nach sieben Tagen ein Chondrogenese nachgewiesen werden, ebenso an den Tagen 14 und 21 (siehe Abb. 4-13).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Therapie von Meniskusläsionen im avaskulären Bereich stellt bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein in der Traumatologie nur unbefriedigend gelöstes Problem dar. Dabei zeigt sich, dass diese Schwierigkeiten schon sehr früh erkannt wurden: „From Hippocrates to the present age it is universally allowed that ulcerated cartilage is a troublesome thing and that, once destroyed, it is not repaired.” (Hunter 1743). Diese Aussage hat nach über zweihundertfünfzig Jahren medizinischer Forschung immer noch ihre Grundgültigkeit. Die momentan häufigste Therapie stellt die partielle Meniskusteilresektion dar. Auf Grund des Substanzverlustes des Meniskus und der damit einhergehenden frühzeitigen Gonarthrose ist dieser Therapieansatz nicht zuletzt auch wegen der enormen volkswirtschaftlichen Folgekosten unzufriedenstellend.

Im vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass sich für die Reparatur von avaskulären Meniskusdefekten mesenchymale Stammzellen auf Grund ihres chondrogenen Potentials grundsätzlich eignen. Im Tiermodell am Kaninchen wurde ferner die Problematik der interspezifischen Übertragbarkeit deutlich, da die Chondrogeneseleistung in geringerem Ausmaß, als beim Humanmaterial bereits nachgewiesen, erfolgte. Ein spezifischer Vergleich von aus Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Stammzellen und originären Meniskuszellen war deshalb nicht möglich. Der positive Einfluss hydrostatischer Belastung auf die Qualität von Tissue Engineertem Meniskusgewebe ließ sich für beide Zelltypen, sowohl für originäre Meniskuszellen, als auch für mesenchymale Stammzellen, histologisch nachweisen. Allerdings war bei den mesenchymalen Stammzellen die Chondrogeneseleistung im Vergleich geringer.

Als mögliche Ursachen für dieses Ergebnis wurden verschiedene Versuchsparameter abgeändert, um negative, systembedingte Einflüsse ausschließen zu können.

Die vorliegende Arbeit bestätigt das grundsätzlich vorhandene chondrogene Potential von mesenchymalen Stammzellen und originären Meniskuszellen, wobei ein positiver Effekt von hydrostatischer Belastung auf die Chondrogeneseleistung für beide Zelltypen erbracht werden konnte.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass auf dem Weg zur Heilung avaskulärer Meniskusrisse mittels Tissue Engineering noch Forschungsbedarf besteht, allerdings prinzipiell viel versprechend und möglich erscheint.

7. Literaturverzeichnis

1. McDermott ID SFB Aea. An anatomical study of meniscal allograft sizing. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy* 12: 130-5, 2004.
2. Noble J. Lesions of the menisci. Autopsy incidence in adults less than fifty-five years old. *Bone Joint Surg [Am]* 59: 480-3, 1977.
3. H.-P.Bruch OT. *Chirurgie. Lehrbuch* 376-7, 2008.
4. Sutton J. *Ligaments: Their Nature and Morphology*. London: MK Lewis 1897.
5. Fukubayashi T TPS Mea. An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation and torque. *J Bone Joint Surg Am* 64: 258-64, 1982.
6. Hsieh HH WP. Stabilizing mechanism of the loaded and unloaded knee joint. *J Bone Joint Surg Am* 58: 87-93, 1976.
7. Levy IM TPWR. The effect of the medial meniscectomy on anterior-posterior rotation of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 64: 883-8, 1982.
8. Armstrong CG MV. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone Joint Surg Am* 64: 88-94, 1982.
9. Bourne RB FJPPea. The effect of medial meniscectomy on strain distribution in the proximal part of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* 66: 1431-7, 1984.
10. Walker PS EM. The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop* 109: 184-92, 1975.
11. Kazushsa Nakao RMT Tea. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods* 4: 227-30, 2007.
12. Seedhom BB TK. Knee forces during the activity of getting out of a chair with and without the aid of arms. *Biomed Eng* 11: 278-82, 1976.
13. Cooper DE ASWR. Meniscal repair. *Clin Sports Med* 10: 529-48, 1991.
14. O'Connor BL. The mechanoreceptor innervation of the posterior attachments of the lateral meniscus of the dog knee joint. *J Anat* 138: 15-26, 1984.
15. Wilson AS LPMJ. Studies on the innervation of the medial meniscus in the human knee joint. *Anat Rec* 165: 485-91, 1969.
16. Ihn JC KSPI. In vitro study of contact area and pressure distribution in the human knee after partial and total meniscectomy. *Int Orthop* 17: 214-8, 1993.
17. Kohn D MB. Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study. *Arthroscopy* 11: 96-103, 1995.

18. Stärke C. Form und Funktion von Menisken. *Arthroskopie* 21: 223-8, 2008.
19. Arnoczky SP WR. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 10: 95, 1982.
20. Arnoczky SPRFW. The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med* 11: 131-41, 1983.
21. Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 16: 343-56, 1987.
22. Dandy DJ. The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions. *J Bone Joint Surg Br* 72: 628-33, 1990.
23. Poehling GG RDCS. The landscape of meniscal injuries. *Clin Sports Med* 9: 539-49, 1990.
24. Becker R. Meniskusverletzungen: Untersuchung zur Meniskusnaht und Meniskusheilung. Habilitationsschrift 2002.
25. Bellabarba C B-JC. Patterns of meniscal injury in the anterior cruciate-defient knee: a review of the literature. *Am J Orthop* 26: 18-23, 1997.
26. Stone KR. Current and future directions for meniscus repair and replacement. *Clin Orthop* 367: 273-80, 1999.
27. McNicholas MJ RDMDea. Total meniscectomy in adolescence. A thirty-year follow-up. *J Bone Joint Surg [Br]* 82: 217-21, 2000.
28. Neyret P DSDh. Results of partial meniscectomy related to the state of the anterior cruciate ligament. Review at 20 to 35 years. *J Bone Joint Surg [Br]* 75: 36-40, 1993.
29. Higuchi H KMSKea. Factors affecting long-term results after arthroscopic partial meniscectomy. *Clin Orthop* 377: 161-68, 2000.
30. Scheller G SCBJ. Arthroscopic partial lateral meniscectomy in an otherwise normal knee: clinical, functional and radiographic results of a long-term follow-up study. *Arthroscopy* 17: 946-52, 2001.
31. Englund M LL. Risk faktors for symptomatic knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy. *Arthritis Rheum* 50: 2819, 2004.
32. Little C SSGPBC. Histomorphical and immunohistochemical evaluation of joint changes in a model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy in sheep. *J Rheumatol* 24: 2199-209, 2004.
33. Radin EL RR. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop* 34-40, 1986.
34. Paletta GAJ MTSE. The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study. *Am J Sports Med* 25: 692-8, 1997.

35. Wilmes P PDLOS R. Klinische Langzeitergebnisse nach Meniskusnaht. *Arthroskopie* 21: 245-52, 2008.
36. Milachowski KA KDWC. Meniscus replacement using Hoffa's infrapatellar fat bodies - initial clinical results. *Unfallchirurgie* 16: 190-5, 1990.
37. Noyes FR B-WS. Irradiated meniscus allografts in the human knee: a two to five year follow-up study. *Orthop Trans* 19: 417, 1995.
38. Cameron JC SS. Meniscal allograft transplantation for unicompartmental arthritis of the knee. *Clin Orthop* 337: 164-71, 1997.
39. Messner K. The longterm prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee. A 14 year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 67: 165-8, 1996.
40. Hangody L. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy* 5: 262-7, 1997.
41. Brittberg M TTeal. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 391 Suppl: 337-48, 2001.
42. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop* 391 Suppl: 306-17, 2001.
43. Martinek V IA. Das künstliche Meniskusimplantat. *Arthroskopie* 21: 266-70, 2008.
44. Maher SA HCCM. What's new in orthopaedic research? *J Bone Joint Surg Am* 88: 2314-21, 2006.
45. Benninghoff A. Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß verschiedenartiger mechanischer Beanspruchung auf den Knorpel. *Verh Anat Ges* 33: 194, 1924.
46. Roux. *Der Kampf der Teile im Organismus*. Leipzig, Engelmann 1881.
47. Pauwels. *Grundriß einer Biomechanik der Frakturheilung*. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag 1941.
48. Carter DR. Mechanical loading history and skeletal biology. *Journal of biomechanics* 20: 1095-109, 1987.
49. Freed LE, Martin I, Vunjak-Novakovic G. Frontiers in tissue engineering. In vitro modulation of chondrogenesis. *Clinical orthopaedics and related research* 367 Suppl: 46-58, 1999.
50. Carver SECAH. Influence of intermittent pressure, fluid flow, and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes. *Biotechnology and bioengineering* 65: 274-81, 1999.
51. Smith RLSFReal. In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *Journal of orthopaedic research* 14: 53-60, 1996.

52. Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clinical orthopaedics and related research* 355 Suppl: 41-55, 1998.
53. Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Frank EH, Davila SG, Bhaktav NR, Trippel SB. The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I. *Journal of orthopaedic research* 19: 11-7, 2001.
54. Carver SEaCAH. Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage. *Tissue engineering* 5: 1-11, 1999.
55. Grimshaw MJ, Mason RM. Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression in vitro by oxygen tension. *Osteoarthritis and cartilage* 9: 357-64, 2002.
56. Lee HS, Millward-Sadler SJ, Wright MO, Nuki G, Al-Jamal R, Salter DM. Activation of Integrin-RACK1/PKCalpha signalling in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Osteoarthritis and cartilage* 10: 890-7, 2002.
57. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, Caldwell H, Nuki G, Salter DM. Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and cartilage* 8: 272-8, 2000.
58. Sah RL, Kim YJ, Doong JY, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *Journal of orthopaedic research* 7: 619-36, 1989.
59. Wright MO, Nishida K, Bavington C, Godolphin JL, Dunne E, Walmsley S, Jobanputra P, Nuki G, Salter DM. Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for alpha 5 beta 1 integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. *Journal of orthopaedic research* 15: 742-7, 1997.
60. Henderson JH, Carter DR. Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures. *Bone* 31: 645-53, 2002.
61. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Freed LE. Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology* 39: 259-68, 2002.
62. Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, Yoo J. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *Journal of biomedical materials research* 85: 445-55, 2008.
63. Angele P AJKRea. Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998 205-8, 1998.
64. Walsh CJ GDea. Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng* 5(4): 327-37, 1999.
65. Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B. Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue engineering* 5: 545-54, 1999.

66. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-9, 2002.
67. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238: 265-72, 1998.
68. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7, 1999.
69. Heatley FW. The meniscus--can it be repaired? An experimental investigation in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery* 62: 397-402, 1980.
70. <http://www.tissue-engineering.net/index.php?seite=whatiste>. Webadresse 1. website 2008.
71. Tanaka T FKKY. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy* 7: 75-80, 1999.
72. Collier S, Ghosh P. Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis and cartilage* 3: 127-38, 1995.
73. Bhargava MM, Attia ET, et al. The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *The American journal of sports medicine* 27: 636-43, 1999.
74. Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK, Davidson JM. Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *Journal of orthopaedic research* 13: 201-7, 1995.
75. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *International review of cytology* 159: 265-358, 1995.
76. Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, Yoo J. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *Journal of biomedical materials research* 85: 445-55, 2008.
77. Webber RJ. In vitro culture of meniscal tissue. *Clinical orthopaedics and related research* 252: 114-20, 1990.
78. Webber RJ, Harris MG, Hough AJ Jr. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *Journal of orthopaedic research* 3: 36-42, 1985.
79. Webber RJ, York JL, Vanderschelden JL, Hough AJ Jr. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *The American journal of sports medicine* 17: 393-400, 1989.

80. Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ Jr. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *Journal of orthopaedic research* 6: 13-23, 1988.
81. Mauck RL M-DGYXea. Regional multilineage differentiation of meniscal fibrochondrocytes; implications for meniscal repair. *Anat Rec* 290: 48-58, 2007.
82. Ishimura M, Ohgushi H, Habata T, Tamai S, Fujisawa Y. Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part I: Experimental study. *Arthroscopy* 13: 551-7, 1997.
83. Angele P SDAMEal. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 41, 335-346. 2004.
Ref Type: Journal (Full)
84. Detlef Schumann. **Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur osteochondraler Defekte** . 2004.
Ref Type: Thesis/Dissertation
85. Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 33 (1): 1-13, 2003.
86. Sah RL DJGAPASJD. Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 286: 20-9, 1991.
87. Grenier G RZMea. Tissue Reorganization in Response to Mechanical Load Increases Functionality. *Tissue engineering* 11: 90-100, 2005.
88. Wu QQ, Chen Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Experimental cell research* 256: 383-91, 2000.
89. Blain EJ, Mason DJ, Duance VC. The effect of cyclical compressive loading on gene expression in articular cartilage. *Biorheology* 40: 111-7, 2003.
90. Ateshian GA WWKJGRMVC. Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments. *Journal of biomechanical engineering* 30: 1157-64, 1997.
91. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments.". *Journal of biomechanical engineering* 102: 73-84, 1980.
92. Armstrong CG, Lai WM, Mow VC. An analysis of the unconfined compression of articular cartilage. *Journal of biomechanical engineering* 106: 165-73, 1984.
93. Holmes MH, Lai WM, Mow VC. Singular perturbation analysis of the nonlinear, flow-dependent compressive stress relaxation behavior of articular cartilage. *Journal of biomechanical engineering* 107: 206-18, 1985.

94. Mentré P HBHG. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *International review of cytology* 201: 1-84, 2001.
95. Hall AC UJGKA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *Journal of orthopaedic research* 9: 1-10, 1991.
96. Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *Journal of cellular physiology* 193: 319-27, 2002.
97. Ikenoue T, Trindade MC, Lee MS, Lin EY, Schurman DJ, Goodman SB, Smith RL. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *Journal of orthopaedic research* 21: 110-6, 2003.
98. Lee MS Tlea. Protective effects of intermittent hydrostatic pressure on osteoarthritic chondrocytes activated by bacterial endotoxin in vitro. *Journal of orthopaedic research* 21: 117-22, 2002.
99. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development* 14: 2123-33, 2000.
100. Takahashi K, Kubo T, Kobayashi K, Imanishi J, Takigawa M, Arai Y, Hirasawa Y. Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line. *Journal of orthopaedic research* 15: 150-8, 1997.
101. Bult H, Boeckxstaens GE, et al. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346-7, 1990.
102. Sironen R, Elo M, et al. Transcriptional activation in chondrocytes submitted to hydrostatic pressure. *Biorheology* 37: 85-93, 2000.
103. Jortikka MO, Parkkinen JJ, et al. The role of microtubules in the regulation of proteoglycan synthesis in chondrocytes under hydrostatic pressure. *Archives of biochemistry and biophysics* 374: 172-80, 2000.
104. Parkkinen JJ, Lammi MJ, et al. Altered Golgi apparatus in hydrostatically loaded articular cartilage chondrocytes. *Annals of the rheumatic diseases* 52: 192-8, 1993.
105. Angele P, Yoo JU, Smith C, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *Journal of orthopaedic research* 21: 451-7, 2003.
106. Hu JC, Athanasiou KA. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs. *Tissue engineering* 12: 1337-44, 2006.
107. Suh JK, Li Z, Woo SL. Dynamic behavior of a biphasic cartilage model under cyclic compressive loading. *Journal of biomechanics* 28: 357-64, 1995.

108. Hansen U, Schünke M, et al. Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *Journal of biomechanics* 34: 941-9, 2001.
109. Giannoni P, CAMMea. Species Variability in the Differentiation Potential of in Vitro-Expanded Articular Chondrocytes Restricts Predictive Studies on Cartilage Repair using Animal Models. *Tissue engineering* 11: 237-48, 2005.
110. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell and tissue research* 333: 207-15, 2008.
111. Sakao K, TKAY, et al. Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 805-14, 2008.
112. Huibregtse BA, Johnstone B, Goldberg VM, Caplan AI. Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Journal of orthopaedic research* 18: 18-24, 2001.
113. Milan Mrksich and George M. Whitesides. USING SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS TO UNDERSTAND THE INTERACTIONS OF MAN-MADE SURFACES WITH PROTEINS AND CELLS. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25: 55-78, 1996.
114. Verné E, Vitale-Brovarone C. Surface functionalization of bioactive glasses. *Journal of biomedical materials research Part A* 2008.

8. ANHANG

8.1 Abkürzungen

BMP	Bone Morphogenic Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetal bovine serum
Hz	Hertz
IGF	Insulin like growth Factor
IL	Interleukin
i.m.	intermuskulär
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MEFO	Methanol-Formaldehyd-Phosphatpuffer-Lösung
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPa	Mega Pascal
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal progenitor cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PenStrep	Antibiotikamischung aus Benzylpenicillin-Procaïn und Dihydrostreptomycin
rpm	rounds-per-minute
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute Medium
TGF	Transforming Growth Factor
VE	voll entsalztes, auch demineralisiertes Wasser genannt

8.2 Lebenslauf

31.12.81	als erstes Kind von Brigitte Heinrich, geb. Bauer und Maximilian Josef Heinrich in Vilsbiburg geboren
1987 – 1991	Grundschule Loizenkirchen
1991 – 1999	Maximilian-von-Montgelas-Gymnasium, Vilsbiburg
1999 – 2001	Hans-Carossa-Gymnasium, Landshut mit Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
2001 – 2002	Zivildienst im Bezirkskrankenhaus Landshut, Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und –psychotherapie, Station 3.3
2003 – 2008	Studium der Zahnheilkunde an der Universität Regensburg
April 2004	naturwissenschaftliche Vorprüfung, Ergebnis „gut“
September 2005	zahnärztliche Vorprüfung, Ergebnis „gut“
Juli 2008	Staatsexamen, Ergebnis „sehr gut“
August 2008	Approbation als Zahnarzt
Sept. 2008 – März 2009	ehrenamtliche Tätigkeit als Zahnarzt in Dakar, Senegal im House of Hope Medical Center
seit April 2009	Assistenz Zahnarzt in der oralchirurgischen Praxis Dres. C. Schulte/S. Schulte-Gross in Freudenstadt

8.3 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, bedanken:

zuerst möchte ich mich bei Gott bedanken, der seine Hand immer über mich gehalten hat und eine Welt geschaffen hat, die so begeisternd und „erforschenswert“ ist.

Herrn Prof. Dr. Peter Angele sage ich herzlichen Dank für die Überlassung eines spannenden Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen sowie freundliche und unkomplizierte Betreuung der Arbeit.

Mein Dank geht auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Angele. Insbesondere Herrn Dr. Richard Kujat für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, Herrn Thomas Böttner für die Einführung in die Welt der sterilen Medizintechnik und Frau Daniela Drenkard für ihr stets offenes Ohr und ihrer Unterstützung bei allen Arten von technischen Problemen. Die zahlreichen Anregungen und intensiven wie produktiven Diskussionen haben viel zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Besonders möchte ich mich aber bei meiner Familie bedanken: für die stete Unterstützung im gesamten Studium und die Möglichkeit daheim immer davon abschalten zu können.

Und natürlich bei meiner geliebten Verlobten Maleika: du hast mich zu jedem Zeitpunkt motiviert und unterstützt. Ich hoffe dir die gleiche Hilfe bei deiner Dissertation sein zu können.