

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

**KNOCHENREKONSTRUKTION MIT  
AUTOLOGEN MESENCHYMALEN  
STAMMZELLEN AM KLEINTIERMODELL**

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

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Carola Pfaller**

**2010**



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

**KNOCHENREKONSTRUKTION MIT  
AUTOLOGEN MESENCHYMALEN  
STAMMZELLEN AM KLEINTIERMODELL**

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

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Carola Pfaller**

**2010**

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Angele

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2010

Die Promovendin ist Ärztin.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BMP	bone morphogenetic protein
ca	circa
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Zentimeter zum Quadrat
CO	Kobalt
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAB	Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
Dig.	Digitus
ECM	Extracellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
FBS	Fetales Kälberserum
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
GH	Growth Hormone
h	Stunde
HCL	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
i.e.	Injektionseinheit
i.m.	intramuskulär
ITS	Insulin Transferrin Selenit

i.v.	intravenös
MSC	mesenchymale Stammzellen
KG	Körpergewicht
Koll I	Kollagen Typ I
Koll II	Kollagen Typ II
Koll X	Kollagen Typ X
Lig.	Ligamentum
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
Ni	Nickel
OP	osteogenic protein
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	pondus Hydrogenii
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SC-Arthrodesse	Arthrodesse zwischen Os scaphoideum und Os capitatum
STT-Arthrodesse	Arthrodesse zwischen Os scaphoideum, Os trapezum, Os trapezoideum
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	
1.1	Grundlagen der Lunatumnekrose	9
1.2	Anatomie des Handgelenks	11
1.3	Anatomie und Physiologie des Gelenkes	12
1.4	Ossifikation	15
1.5	Mesenchymale Stammzellen	16
1.6	Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	19
1.7	Biomaterialien	19
1.8	Fragestellung	22
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>24</b>
2.1	Material	24
2.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	24
2.1.2	Medien und Lösungen	25
2.1.3	Matrices	30
2.1.4	Tiere	31
2.2	Methoden	31
2.2.1	Gewinnung mesenchymaler Stammzellen der New Zealand White Rabbits	31
2.2.2	Besetzen der Matrices mit mesenchymalen Stammzellen, Herstellung von Zellaggregaten und chondrogene Differenzierung	32
2.2.3	<i>In vitro</i> Chondrogenesemodell	33
2.2.4	Tierversuch	35
2.2.4.1	Tier-Operation	35
2.2.4.2	Polychrome Fluoreszenzmarkierung	37
2.2.4.3	Röntgenologische Untersuchung	38
2.2.4.4	Gewinnung der Präparate	38
2.2.4.5	Histologie und Immunhistochemie	39

<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>42</b>
3.1	Zellkultivierung	42
3.2	Differenzierungsverhalten in vitro	43
3.3	Tierversuch	45
3.3.1	Radiologische Auswertung	45
3.3.2	Histologische Ergebnisse der Kontrollgruppen	47
3.3.3	Histologische Ergebnisse nach 2 Wochen	49
3.3.4	Histologische Ergebnisse nach 6 Wochen	51
3.3.5	Histologische Ergebnisse nach 12 Wochen	53
3.3.6	Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie	56
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>62</b>
4.1	Methodische Überlegungen	62
4.2	<i>In vitro</i> Chondrogenesemodell	64
4.3	Tierexperimentelle Ergebnisse	65
4.4	Zukunftsperspektiven	70
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b>91</b>



## 1 Einleitung

### 1.1 Grundlagen der Lunatumnekrose

Die Krankheit der Lunatumnekrose wurde erstmals 1910 von dem Radiologen Robert Kienböck beschrieben, wobei er in seiner Arbeit über „Traumatische Malazien des Mondbeins und ihre Folgezustände: Entartungsformen und Kompressionsfrakturen“ berichtete (*Kienböck, 1910*). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung aus der Gruppe der aseptischen Osteonekrosen. Betroffen sind vor allem handwerklich tätige Männer mit einem Erkrankungsgipfel zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, zu meist an der dominanten Hand. Nur selten ist ein bilaterales Auftreten der Lunatumnekrose zu finden, wie es Kleinert bei 13% der Patienten beschrieb (*Kleinert, 1966*). Führendes Symptom der Erkrankung ist ein brennender Schmerz, der schon in Ruhe und bei leichter Belastung auftreten kann und später in ein Stadium des diffusen, belastungsabhängigen Schmerzes übergeht, auf das häufig ein symptomfreies Intervall folgt. Abhängig vom Stadium kommt es im Verlauf zu arthroseähnlichen Bewegungseinschränkungen und Kraftverlusten der betroffenen Hand. Auch symptomlose Verläufe sind beschrieben.

Der genaue Pathomechanismus der Lunatumnekrose erscheint bis heute unklar, wobei verschiedene, mechanische, metabolische, anatomische und auch äußere Einflüsse diskutiert werden. So gibt es Hinweise, dass eine vermehrte Druckbelastung auf das Mondbein als Ursache seiner Nekrose gilt, welche z.B. durch Veränderung der Statik des Handgelenkes begünstigt wird (*Giunta et al., 1998*). 75%-90% aller betroffenen Patienten weisen eine sogenannte Ulnar-Minusvariante auf, welche bei gesunden Probanden nur in 35-50% der Fälle vorkommt (*Garcia-Elias et al., 1997*). Eine durch Vibration und dadurch bedingte repetitive Mikrotraumatisierung des Os lunatum verursachte Nekrose gilt als heute gesichert und ist als Berufskrankheit Nr. 2103 bei exponierten Risikogruppen, vor allem Arbeiten mit Pressluftmaschinen, und Vorhandensein zahlreicher Kriterien anerkannt. Bei einem auf dem Boden einer venösen Abflussstörung entstandenen ossären Kompartmentsyndrom kommt es zu einer Störung des Knochenstoffwechsels und folglich zur beschriebenen aseptischen Nekrose. So wurde gezeigt, dass der intraossäre Druck in nekrotischen Ossa lunata höher als in gesunden ist (*Schiltenford et al., 1996; Pichler et al., 2002*). Auch systemische, vor allem gefäßschädigende Erkrankungen, wie der systemische Lupus erythematosus oder die systemische Sklerodermie werden als Ursache für die Entstehung der Lunatumnekrose gesehen (*Matsumoto et al., 1999; Mok et al., 1997*). Zudem wird auch Kortikosteroiden eine

Rolle hierbei zugeschrieben (*Taniguchi et al., 2002*). Auch einmalige Traumen, wie eine Fraktur oder ein Stauchungstrauma, werden in der Literatur als mögliche Ursache diskutiert (*Stahl, 1947; Mirabello et al., 1987*).

Aufgrund der verschiedenen Hypothesen zur Pathogenese der Lunatumnekrose sind zahlreiche Ansätze von konservativen, operativen und experimentellen Therapiekonzepten beschrieben. Als konservative Maßnahme eignet sich die Ruhigstellung des Handgelenks mittels einer Gipsschiene. Cvitanich und Solomon konnten zeigen, dass es bei einem achtjährigen Kind durch konsequente Ruhigstellung über einen Zeitraum von 4,5 Monaten zu einer kompletten Ausheilung der Nekrose kam (*Cvitanich und Solomon, 2004*). Operative Möglichkeiten zur Behandlung der Lunatumnekrose sind zum Einen durch niveauangleichende Operationen, einem Gelenkstufenausgleich oder intrakarpalen Arthrodesen gegeben. Durch eine Radiusosteotomie und der damit verbundenen Niveauänderung im Handgelenk konnte eine signifikante Druckentlastung in der Fossa lunata erreicht werden (*Werner und Palmer, 1993, Almquist et al., 1982; Weiss et al., 1991; Zenzai et al., 2005*). Randall et al. beschrieben die Verkürzungsosteotomie des Os capitatum in Kombination mit einer interkarpalen Arthrodesen zwischen Os capitatum und Os hamatum (*Randall et al., 1998*). Auch die SC-Arthrodesen zwischen Os scaphoideum und Os capitatum (*Garcia-Elias et al., 1998*) oder die STT-Arthrodesen (Os scaphoideum, Os trapezium, Os trapezoideum) sollen die Belastungen auf das Os lunatum reduzieren. Die Entfernung der kompletten proximalen Handwurzelknochenreihe (proximal row carpectomy) als Therapieoption bleibt den Spätstadien der Lunatumnekrose vorenthalten (*El-Mowafi et al., 2006*). Weitere operative Therapieansätze stellen Revaskularisationsversuche dar. Durch Entfernung von abgestorbenem Knochenmaterial des nekrotischen Mondbeins, das in seiner Struktur noch erhalten ist, wird an dessen Stelle das Os pisiforme, das an seinem versorgenden Gefäß, der Arteria ulnaris, gestielt ist, eingepasst. Dadurch soll es laut Daecke et al. zur Ausheilung der Mondbeinnekrose kommen (*Daecke et al., 2005*). Ähnlich gingen Bengoechea-Beeby et al. vor, indem sie ein vaskularisiertes Knochentransplantat aus einem Os metacarpale in das vorpräparierte Os lunatum setzten (*Bengoechea-Beeby et al., 2001*). Alternative Verfahren, wie zum Beispiel das Einsetzen von Silikon-Spacern nach Ausbau des nekrotischen Os lunatums, wurden aufgrund heftiger immunologischer Begleitreaktionen aufgegeben (*Roca et al., 1976*). Die alleinige Entfernung des Mondbeins wird aufgrund des drohenden Kollapses abgelehnt. Shigematsu et al. füllten in einer experimentellen Studie den entstandenen Totraum durch Sehneninterponate, hybridisiert mit mesenchymalen Stammzellen (*Shigematsu et al., 2006*). Huang et al. erreichten gute Ergebnisse durch das

Einsetzen von auf Matrices geladenen, autologen mesenchymalen Stammzellen in einem Tierversuch (*Huang et al., 2006*).

Die mangelnde wissenschaftliche Kenntnislage über die stadiengerechte Behandlung der Lunatumnekrose, sowie die Fülle an beschriebenen Behandlungsoptionen zeigen, dass ein allgemein akzeptiertes Therapieverfahren bisher zu fehlen scheint.

Revaskularisationsoperationen erscheinen aufgrund der zugrundeliegenden Mangeldurchblutung durchaus attraktiv, müssen jedoch erst auf längere Zeit hin etabliert werden. Niveauangleichende Operationen und Arthrodesen weisen derzeit im Bezug auf die Reduktion der Symptome auf gute Wirksamkeit hin, bringen jedoch den Nachteil möglicher Bewegungseinschränkungen mit sich. Lunaturnersatzverfahren könnten diesem Bewegungsverlust entgegenwirken. So könnten zellbasierte Tissue Engineering Strategien mit mesenchymalen Stammzellen in Zukunft eine Alternative sein, um Gelenkerkrankungen zu behandeln (*Huang et al., 2006*), da das Potential zur Füllung von verschiedenen artikulären Defekten im Knorpel oder subchondralen Knochen bereits in verschiedenen Studien und Tierversuchen erkannt wurde (*Im, 2001; Wakitani, 1994*).

### **1.2 Anatomie des Handgelenks**

Das Handgelenk kann in zwei Teilgelenke, das Radiokarpal- und das Mediokarpalgelenk, unterteilt werden, die eine funktionelle Einheit bilden und klinisch als ein Gelenk zusammengefasst werden. Die karpalen Knochen sind in zwei Reihen zu je vier Knochen angeordnet. Die proximale Reihe besteht von radial beginnend aus Os scaphoideum, Os lunatum und Os triquetrum, welchem palmar das Os pisiforme als Sesambein des Musculus carpi flexor ulnaris anliegt. Zusammengehalten wird die proximale Reihe durch das Lig. interosseum scapholunatum und das Lig. interosseum lunotriquetrum. In der distalen Reihe befinden sich von radial beginnend das Os trapezium, Os trapezoidium, Os capitatum und Os hamatum, die auf der einen Seite mit der proximalen Handwurzelknochenreihe, nach distal mit den Ossa metacarpalia artikulieren. Straffe Bandverbindungen (Lig. intercarpalia dorsalia, palmaria und interossea) stabilisieren die distale Reihe (*Wirth, 2003*). Namensgebend für das Os lunatum ist seine äußere Form, die an einen Viertelmond erinnert. Es artikuliert proximal mit dem Radius in der Fovea lunata und distal mit dem Os hamatum. Seine arterielle Versorgung erfolgt von palmar über die Arteria ulnaris und Arteria interossea

anterior, von dorsal über die Arteria radialis, wobei sich die Gefäße intraossär verzweigen und anastomosieren.

### 1.3 Anatomie und Physiologie des Gelenks

#### *Funktion, Aufbau und Zusammensetzung des Gelenkknorpels*

Der Gelenkknorpel bildet zusammen mit der Synovialmembran und der Gelenkflüssigkeit eine funktionelle Einheit, die durch umgebende Strukturen wie die Gelenkkapsel und die subchondrale Knochenregion unterstützt wird. Als Überzug der kongruierenden Flächen echter Gelenke ist der hyaline Knorpel für die Verteilung der einwirkenden Kräfte und die Reduzierung der Beanspruchung der am Gelenkaufbau beteiligten Bindegewebe verantwortlich. Er übernimmt die Lastverteilung und die Herabsetzung der mechanischen Druckbelastung auf den subchondralen Knochen (*Bruns und Steinhagen, 2000*). Zudem wird durch ihn ein reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen ermöglicht. Gelenkknorpel ist nicht innerviert und findet keinen Anschluss an das Blut- oder Lymphsystem, so dass der bradytrophe Stoffwechsel ausschließlich durch Diffusion vom Gelenkspalt aus geschieht und teils durch onkotische oder intermittierende Druckansprüche gefördert wird (*Metz, 2001*). Diese biologischen Besonderheiten bedingen im Wesentlichen seine mangelnde Selbstheilungspotenz (*Bruns et al., 2000*).

Gelenkknorpel wird in vier Zonen unterteilt. In Zone I, der Tangentialzone, deren Kollagengehalt hoch und der Proteoglykangehalt niedrig ist, liegen spindelförmig angeordnete Chondrozyten (*Bruns et al., 2000*). Diese runden sich in Zone II (Übergangszone) zunehmend ab, der Proteoglykangehalt steigt hier an. In der dritten Zone, der breiten Radiärzone, liegen die Zellen säulenartig angeordnet, der Proteoglykangehalt ist am höchsten, der Wassergehalt am niedrigsten. In Zone IV, der Mineralisierungszone, findet man Kalziumkristalle in der Knorpelmatrix, da es hier zu zunehmender Verknöcherung kommt. Zwischen Zone III und IV liegt die sogenannte Tidemark, eine subchondrale Lamelle (*Rudert und Wirth, 1997*).

Gelenkknorpel besteht zum größten Teil aus 70-80% gebundenen Wassers. Organische und anorganische Bestandteile (20-30%), v.a. Kollagene und Proteoglykane, aber auch Proteine, Glykoproteine und Lipide, bilden die extrazelluläre Matrix (Tab. 1). Mit 90 % nimmt Kollagen vom Typ II den größten Anteil der Kollagene ein, aber auch andere Typen, wie Typ

V, VI, IX und XI werden von den Chondrozyten, welche 1-10% des Gelenkknorpels ausmachen, gebildet (*Burgeson und Nimni, 1992*). Chondrozyten stellen die einzige Zellart im Gelenkknorpel dar und liegen geschützt in der Matrix eingebettet. Neben den Kollagenen bilden sie Proteoglykan-Hyaluronsäure-Aggregate, welche zu 95% aus Glykosaminoglycanen, Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure und Keratansulfat bestehen und aufgrund ihres hohen Wasserbindungsvermögens für die Druckelastizität des Gelenkknorpels verantwortlich sind (*Athanasion et al, 1991*).

Bestandteile	Anteil in %
- Chondrozyten	1-10
- Wasser	70-80
- Kollagen	12-14
- Typ I	10-12
- Typ IX	ca. 1
- Typ XI	ca.1
- Proteoglykane	7-9
- Mineralsubstanzen	< 4
- Matrixproteine	< 1

**Tab. 1:** Zusammensetzung des Gelenkknorpels (Metz, 2001)

### *Funktion, Aufbau und Zusammensetzung des subchondralen Knochens*

Der subchondrale Knochen liegt unmittelbar unterhalb der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels. Er setzt sich aus trabekulären Knochen und dem Knochenmark zusammen (*Duncan et al., 1987*). Die Knochentrabekel richten sich entlang der Zug- und Drucklinien aus. Bei einer Belastungsänderung werden die Trabekel umgebaut und richten sich entsprechend der Kräfte, die auf den Knochen einwirken, aus. Die kortikale Endplatte besteht aus einem System aus Platten, die eine Dicke von 0,2-0,4 mm besitzen und miteinander verbunden sind. Die Zwischenräume dieser Platten sind mit 0,4-0,6 mm relativ klein. Tiefer im Knochen vergrößern sich diese Leerräume beträchtlich und die Platten gehen in die trabekuläre Struktur über (*Müller-Gerbl, 1998*). Der subchondrale Knochen unterscheidet sich individuell in der Trabekeldicke, der Vaskularisation, dem Stoffwechsel und den physisch-chemischen Eigenschaften (*Mow et al., 1991*). Die kortikale Endplatte weist zahlreiche

Perforationen auf, welche Blutgefäße oder Knochenmarkbestandteile enthalten (*Duncan et al., 1987*). Die Dicke der kortikalen Endplatte variiert wie die Gefäßversorgung in Abhängigkeit vom Alter, Körpergewicht, Lage, Funktion und der Genetik. Sie ist gewöhnlich im zentralen, lasttragenden Bereich dicker. Es wird angenommen, dass der Bereich innerhalb des Gelenkes, an dem die Belastung am größten ist, eine höhere Dichte aufweist und die Vaskularisation kräftiger entwickelt ist (*Müller-Gerbl, 1998*). Der subchondrale Knochen ist ein besserer Stoßdämpfer als der hyaline Knorpel. Bei Überbelastungen schützt er den hyalinen Knorpel vor Verletzungen, indem er die auftretenden Kräfte abfängt (*Brown et al., 1984; Hoshino et al., 1987*). Der gesunde subchondrale Knochen ist in der Lage, einen Teil der Belastungen des Gelenkes abzufangen. Der Rest wird vom kortikalen Knochen und der Gelenkkapsel übernommen (*Hoshino et al., 1987*). Der Knorpel und die darunter liegende subchondrale Region verformen sich während der Be- und Entlastung (*Imhof et al., 2000*).

Knochen besteht zu 45% aus einer anorganischen Matrix, zu 25% aus organischen Substanzen, sowie zu 30% aus Wasser. Der Hauptbestandteil der mineralisierten anorganischen Substanz sind Calciumverbindungen, wobei Phosphat zu 50% und Calcium zu 23% vorliegen. Das Mineraliendepot, das hauptsächlich aus kristallinem Hydroxylapatit besteht, wird vom Knochen selbst gebildet und eingelagert und ist für die Stabilität verantwortlich. Zudem lassen sich Karbonate, Natrium, Eisen, und Magnesium in der anorganischen Matrix finden. Die organische Grundsubstanz, das Osteoid, wird durch Calciumsalze stabilisiert und besteht zu 95% aus Kollagen, wovon 90% auf Kollagen Typ I fallen. Die restlichen 5 % sind Proteoglykane und Glycosaminoglycane (*Moll und Moll, 2000*). Neben der anorganischen Matrix und den organischen Substanzen lassen sich verschiedene Zellen im Knochengewebe finden (*Marks und Hermey, 1996*). Osteoblasten, welche von den pluripotenten mesenchymalen Stammzellen abstammen, sind vor allem für die Bildung des Kollagens Typ I verantwortlich. Nicht-kollagene Matrixbestandteile wie Osteocalcin oder Osteopontin werden ebenfalls von den Osteoblasten synthetisiert und bilden im Extrazellulärraum das Osteoid, das durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen mineralisiert wird (*Malaval et al., 1994*). Sobald die Osteoblasten ringsherum von Interzellulärsubstanz eingelagert sind, werden sie Osteozyten genannt. Diese besitzen sowohl die Fähigkeit zur Produktion von Knochensubstanz, als auch zur Knochenresorption (*Banks, 1993*). Bei den sogenannten Knochenbelegzellen oder „Bone lining cells“ handelt es sich wahrscheinlich um Vorläuferzellen der Osteoblasten (*Leaffer et al., 1995*), welche ruhend die Knochenoberfläche bedecken.

Osteoklasten spielen eine wichtige Rolle bei der Osteolyse. Über Protonenpumpen werden Wasserstoffionen zwischen Osteoklasten und Knochen gepumpt, was zu einer Senkung des pH-Wertes und der damit verbundenen Herauslösung von Hydroxylapatitkristallen führt (*Blair et al., 1989*). Der Abbau der organischen Matrix hingegen wird durch proteolytische Enzyme gewährleistet.

### 1.4 Ossifikation

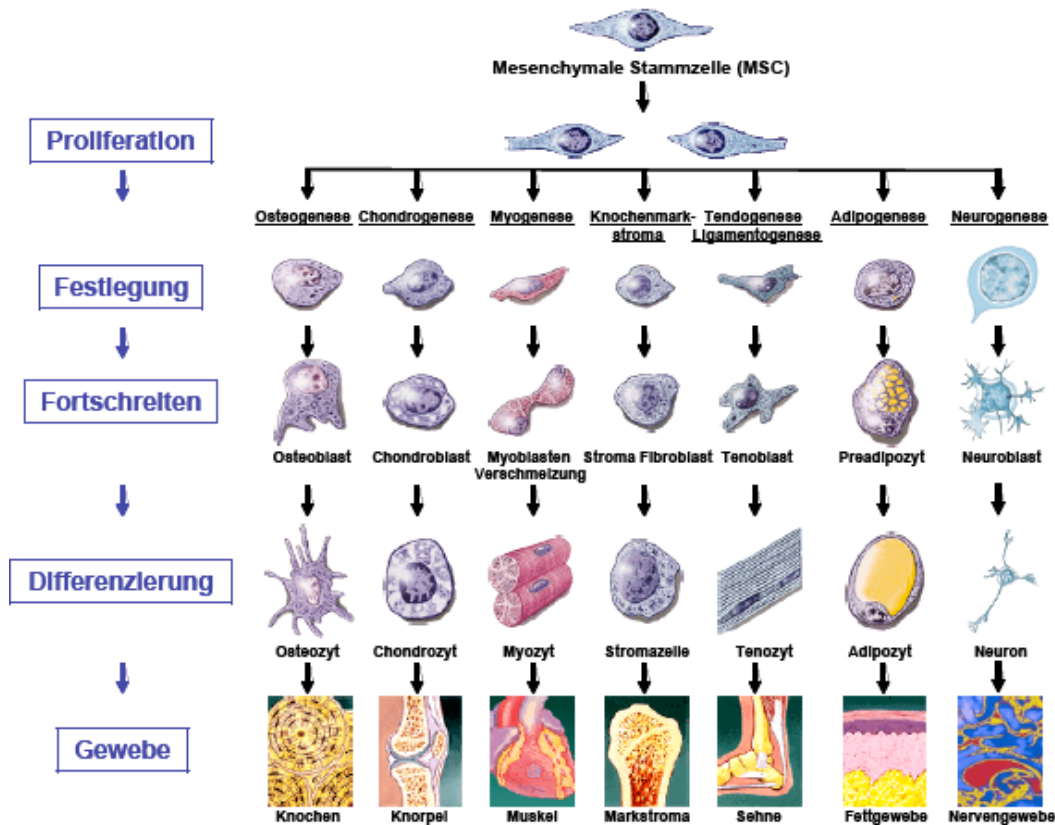
Knochenneubildung (Ossifikation) tritt bei Wachstum, Brüchen und anderen pathologischen Zuständen auf. Man unterscheidet die desmale und die chondrale Knochenneubildung. Die desmale Ossifikation erfolgt auf direktem Weg und lässt jugendlichen Geflechtknochen durch Differenzierung von Fibroblasten oder Mesenchymzellen entstehen. Bei der chondralen Ossifikation erfolgt die Differenzierung der Osteoblasten aus Chondroblasten, das heißt über knorpelige Vorstufen, wobei zwei Wege unterschieden werden. Die perichondrale Ossifikation erfolgt über das Periost. Diese Art der Knochenregeneration findet an langen Röhrenknochen statt und dient dem Dickenwachstum (*Junqueira und Carneiro, 2004*). Desweiteren kann die Verknöcherung auch von innen erfolgen (enchondrale Ossifikation). Durch einen initialen Reiz im Bereich der extrazellulären Matrix des Knorpels kommt es zur Einblutung und Bildung eines Blutkoagels. Bindegewebsstammzellen werden durch Zytokine, wie z.B. den Bone Morphogenetic Proteins (BMP), stimuliert, was zur Induktion osteogener Zellpopulationen führt (*Kübler, 1997*). Undifferenzierte mesenchymale Stammzellen entwickeln sich zu Präosteoblasten. Sie produzieren eine extrazelluläre, knorpelartige Matrix, welche man Osteoid nennt. Die Präosteoblasten differenzieren anschließend zu Chondrozyten (*Caplan, 1990; Recker 1992*). Nach Anlagerung des hyalinartigen Knorpels erscheint ein periostaler Überzug über der Wachstumsregion, der beginnt eine dünne Knochenmanschette auszubilden. Nach teilweiser Mineralisation dieser Knochenmatrix vergrößern sich die Chondrozyten und es bilden sich vaskuläre Knospen in der Wachstumszone. Osteoprogenitorzellen, die diese vaskulären Knospen begleiten, differenzieren in Osteoblasten und schließlich weiter zu Osteozyten. So formt sich eine knöcherne Matrix auf der Grundlage dieses präformierten mineralisierten Knorpels. Mehrkernige Osteoklasten übernehmen den Abbau des mineralisierten Knorpelgewebes und des unreifen Knochens, während Osteoblasten den Komplex aus Knorpel und unreifem Knochen durch reifen lamellären Knochen ersetzen. Im weiteren Verlauf bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Neubildung

und Resorption im äußerlich betrachtet statischen Knochengewebe aus (Bone-Remodelling). Die Vaskularisation des Knochens ist ein wichtiger Faktor dieses physiologischen Remodellings (*Collin-Osdoby, 1994*). Hier spielt die Gefäßneubildung in der Heilungszone eine elementare Rolle. Wachstumsfaktoren, v.a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), nehmen für den Regelkreis der Neovaskularisation eine wichtige Rolle ein. Durch die Permeabilität des Endothels einwachsender Gefäße wird der Austausch von Botenstoffen zwischen dem Blut und den umliegenden Geweben ermöglicht (*DiCorleto und Cimbrone, 1996*). Ohne eine adäquate Blutversorgung sind für Zellen notwendige Austauschprozesse von Nährstoffen, Mineralien und Abbauprodukten nicht möglich. Nur durch eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung, Temperatur- und pH-Regulation läuft eine geregelte Ossifikation ab. Bei Störungen der Knochenvascularisation kommt es folglich zu einer Gewebshypoxie mit anschließender Entzündung, deren Folge Knochengewebsnekrosen und Substanzverluste sein können. Dies wird als mögliche Ursache der Lunatumnekrose beim Morbus Kienböck gehandelt (siehe 1.1.2).

### 1.5 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind undifferenzierte Zellen, die in einer Vielzahl von Geweben vorkommen: Knochenmark, Nabelschnurblut, kompakten Knochen, Fettgewebe, peripherem Blut und embryonalem Somitenmesoderm (*Charbord et al., 2002; Kuznetsov et al., 2001; Campagnoli et al., 2001*). Pittenger geht davon aus, dass allerdings nur etwa 0,001 – 0,01 % aller kernhaltigen Zellen, z.B. im Knochenmark, mesenchymale Stammzellen sind (*Pittenger, 1999*). Sie werden definiert als sich selbst erneuernde, multipotente Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit besitzen in unterschiedliche mesenchymale Phänotypen als Effektorzellen zu differenzieren. Sie haben die Eigenschaft, dass sie über einen langen Zeitraum hin identische Kopien von sich selbst erzeugen (*Löffler und Potten, 1997*). Die Zellerneuerung findet aus einem Reservoir von permanent vorhandenen Stammzellen statt, da sich diese Effektorzellen nach ihrem Untergang nicht selbst erneuern können. Somit verfügen verschiedene Gewebe im menschlichen Körper über Stammzellpopulationen zur Regeneration nach Verletzung, Krankheit oder Alterung. Es handelt sich bei mesenchymalen Stammzellen um Zellen, die sich in unterschiedliche mesenchymale Gewebe, wie z.B. Knochen (*Jaiswal et al., 1997*), Knorpel (*Johnstone et al., 1998*), Sehnen, Bänder, Muskeln (*Wakitani et al., 1995*), Fett und Haut differenzieren können (*Pittenger et al., 1999*) (Abb. 2).

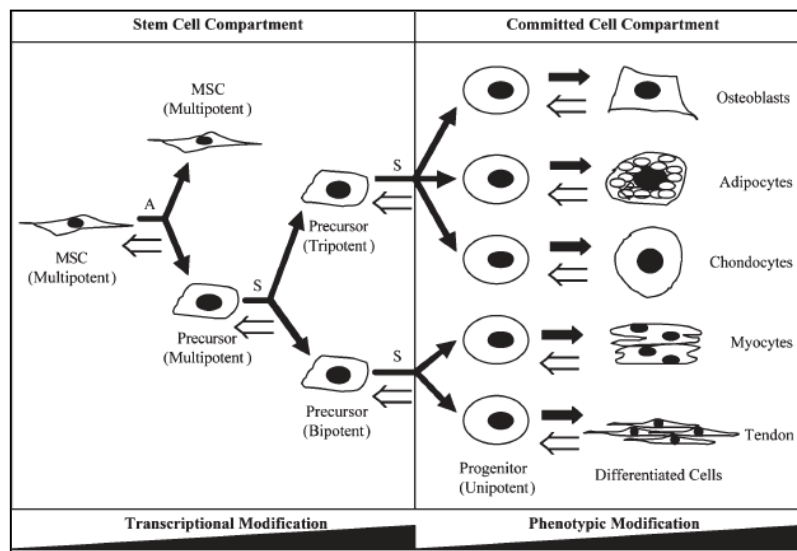




**Abb. 2:** Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle bis zur jeweiligen Effektorzelle. Es handelt sich um ein vereinfachtes Schema. Die einzelnen Differenzierungswege sind von links nach rechts geordnet (links am besten untersucht, abnehmend nach rechts) (Caplan et al., 1994).

Auch Zellkolonien, die sich von klonalen MSC Kulturen ableiten, sind bezüglich ihres Differenzierungspotentials heterogen. So wird berichtet, dass lediglich ein Drittel dieser Zellkolonien tripotent (Chondro-, Osteo-, Adipogenese) ist (Pittenger et al., 1999). Murgalia et al. kommt zu ähnlichen Ergebnissen, wobei die verbleibenden Zellen als bipotent (Chondro-, Osteogenese) und unipotent (Osteogenese) identifiziert wurden (Murgalia et al., 2000). Ein Modell zur Erklärung dieser Beobachtung ist, dass der MSC Pool im Knochenmark sich nicht nur aus wenigen multipotenten Stammzellen zusammensetzt, die sich selbst erneuern und verschiedene Zelltypen generieren, sondern auch aus Subpopulationen von MSC's mit unterschiedlichem, bereits auf eine Zelllinie festgefahrenen Differenzierungsgrad (Bashk et al., 2004). Letztere haben ein begrenztes Selbsterneuerungspotential und entwickeln sich zu terminal differenzierten Zellen der einzelnen Gewebe. Die Unterschiede im Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential spiegeln sich auch *in vitro* wieder, wobei jedoch die Mechanismen der Differenzierung von

mesenchymalen Stammzellen noch nicht ganz verstanden sind. Basierend auf verschiedenen Studien konnte ein Modell zur Regulation der Differenzierung über zwei Ebenen aufgezeigt werden (Baksh *et al.*, 2004). Auf Stammzellebene, dem *Stem Cell Compartment*, generieren MSC Progenitorzellen mit vergleichbarem Phänotyp und Selbsterneuerungspotential. Nach Stimulierung teilen sich diese multipotenten, undifferenzierten MSC asymmetrisch, was eine identische Stammzelle und eine zweite nichtidentische Progenitorzelle hervorbringt. Letztere haben ein eingeschränktes Potential zur Differenzierung, teilen sich symmetrisch und führen so zu tri- und bipotenten Zellen. Die Entwicklung wird in der zweiten Ebene, dem *Comitted Cell Department*, fortgeführt, in der sich die Progenitorzellen der ersten Ebene weiter symmetrisch teilen. Letztendlich entstehen hier heraus unipotente Progenitorzellen und terminal differenzierte Zellen, die sich auf einer festgelegten Zelllinie bewegen und sich auch morphologisch von MSC unterscheiden (Abb. 3). Es zeichnet sich ab, dass voll differenzierte Zellen wieder zu multipotenten Zellen dedifferenzieren können oder sich unter bestimmten Bedingungen entlang einer anderen Zelllinie differenzieren können (Song und Tuan, 2004). Ein genaues Verständnis auf Höhe der zweiten Ebene bleibt bislang unerkannt.



**Abb. 3:** Modelldarstellung zur Differenzierung von MSC: Bevor MSCs einen spezifischen Phänotyp ausbilden, durchlaufen sie zwei Ebenen. Im *Stem Cell Compartment* kommt es durch assymetrische Zellteilung (A) zu weniger potenter Zellpopulation. Diese führt in Form von symmetrischer Teilung (S) zu Vorläuferzellen mit eingeschränktem Differenzierungs- und Erneuerungspotential. Diese tri- oder bipotenten Zellen teilen sich symmetrisch weiter im *Committed Cell Compartment* und entwickeln sich zu voll differenzierten Zellen. Es zeichnet sich ab, dass voll differenzierte Zellen wieder zu multipotenten Zellen dedifferenzieren können oder sich entlang einer anderen Zelllinie differenzieren können (offene Pfeile). (Baksh *et al.*, 2004)

## 1.6 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen benötigen definierte Zellkulturbedingungen, sowie biochemische Faktoren und Substanzen, die die chondrogene Differenzierung induzieren. Werden Chondrozyten in einer Monolayer-Kultur kultiviert, differenzieren sie zu einem fibroblastenartigen Zelltyp (*van der Mark, 1977*). Um diese Dedifferenzierung zu verhindern, beschrieben Johnstone et al. eine Zellkultur in sogenannte High-density-pellets, die bessere Zell-Zell-Interaktionen erlauben und somit eine für die chondrogene Differenzierung nötige kritische Zelldichte erreicht (*Johnstone et al., 1998*).

Jedoch nicht nur die Art der Zellkultur ist für eine erfolgreiche Chondrogenese *in vitro* verantwortlich. Zusätzlich wird ein definiertes, serumfreies Medium mit bestimmten bioaktiven Zusätzen benötigt, um die Differenzierung der Zellen zu Knorpelgewebe zu erreichen. Hierbei spielen zum Einen die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1 (*Barry et al., 2001*), TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 (*Mackay et al., 1998*) eine entscheidende Rolle. Zudem werden nach Johnstone et al. Dexamethason, Insulin, Ascorbat-2-Phosphat und ITS plus zugesetzt, um ein zufriedenstellendes Differenzierungsergebnis zu erreichen (*Johnstone et al., 1998*). Intermittierend hydrostatischer Druck, sowie ein niedriger Sauerstoffpartialdruck stimulieren ebenfalls die Chondrogenese (*Domm et al., 2000*). Angele et al. zeigten eine signifikante Erhöhung von Markergenen in einer Zellkultur unter hydrostatischen Druck im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Angele et al., 2004 (2)*).

Die Identifizierung verschiedener chondrogener Differenzierungsstadien erfolgt über zahlreiche Marker. So weist die Bildung einer aggregan- und proteoglykanreichen extrazellulären Matrix auf das Vorhandensein eines knorpelähnlichen Gewebes hin. Besondere Bedeutung spielen hierbei Chondrozyten-spezifische Kollagene, insbesondere der Nachweis von Gelenkknorpel-spezifischen Kollagen Typ II (*Srinivas et al., 1993*). Die Kombination verschiedener Kollagengruppen, wie Kollagen Typ II, IX und XI, ist typisch für hyalinen Gelenkknorpel.

## 1.7 Biomaterialien

Für den Einsatz eines Stoffes als Biomaterial, das als Transplantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten eingesetzt werden soll, gelten verschiedene Eigenschaften als

Grundvoraussetzung (*Rudert und Wirth, 1998; Solchaga et al., 2000; Hunziker, 2002; Park et al., 2005; Redmann et al., 2005; Stark et al., 2006*):

- Interkonnektierende Porosität

Um die Migration der Zellen in das Biomaterial zu ermöglichen, ist ein hohes Maß an interkonnektierender Porosität nötig. So werden eine ausreichend große Oberfläche für die Interaktion zwischen den Zellen und dem Biomaterial geschaffen, genügend Zwischenräume für die Regeneration der extrazellulären Matrix bereitgestellt und eine minimale Diffusionsbarriere während der *in vitro* Kultur gebildet. Dabei sollte der Porositätsgrad einen größeren Porendurchmesser als der der Zellen aufweisen.

- Biodegradierbarkeit

Idealerweise dient das Biomaterial am Beginn als Stabilitätsträger, der solange erhalten bleibt, bis die Zellen ihre eigene und somit autologe Matrix etabliert haben. Bis zu diesem Zeitpunkt soll die Matrix die gewünschte Organstruktur vorgeben und aufrechterhalten. Die Biodegradierbarkeit des Materials kann u.a. durch die Dichte und die Art seiner Quervernetzungen gesteuert werden (*Reichmann et al., 2005*). Dadurch egalisiert sich die Regenerationsrate des gewünschten Gewebes.

- Biokompatibilität

Die Verträglichkeit zum körpereigenen Gewebe stellt sicher, dass keine Abstoßungsreaktion gegen die Trägermatrix stattfindet. Weder das Material noch seine Degradationsprodukte sollen entzündliche Reaktionen oder Toxizität hervorrufen.

- Verfügbarkeit

Das Material sollte leicht reproduzierbar und herstellbar sein.

- Biomechanische Stabilität

Nur eine gewisse strukturelle und biomechanische Stabilität erlauben den Einsatz eines Biomaterials zur Behandlung osteochondraler Defekte, da einwirkende Kräfte *in vivo* nicht unmittelbar zur Zerstörung der Matrix führen sollten.

- Strukturelle Eigenschaften der Oberfläche

Die Oberflächenstruktur soll die Anheftung, Proliferation und Differenzierung von Zellen erlauben und dabei supportiv einwirken.

### - Sterilisation

Das verwendete Trägermaterial sollte eine gute Möglichkeit zur Sterilisation mittels Gammastrahlen, chemischen Substanzen oder thermischen Behandlungen aufzeigen, um eine mögliche Verunreinigung zu verhindern.

Die Materialien, mit denen im Tissue Engineering gearbeitet wird, lassen sich in synthetisch hergestellte oder Materialien natürlichen Ursprungs unterscheiden. Natürliche Trägermaterialien sind in der Regel biokompatibel, biodegradierbar und setzen sich aus den strukturgebenden Bestandteilen physiologischer Gewebe zusammen. Eine geringe mechanische Stabilität, unkontrollierte Degradationsraten, Sterilisationsschwierigkeiten und die damit zusammenhängende Übertragung von Pathogenen schränken deren Anwendung ein (*Wang et al., 2005*).

Das auf Protein basierende Polymer Fibrin erleichtert und fördert die Gewebsheilung durch den hohen Gehalt an Fibronectin, das als essentielles Protein der Knorpelmatrix die Interaktion zwischen den Zellen und der ECM fördert. Die Abbauprodukte des Fibrins sind physiologisch und damit nicht toxisch, allerdings konnten trotzdem immunologische Reaktionen beobachtet werden (*Frenkel und Di Cesare, 2003*). Aufgrund seiner schlechten mechanischen Eigenschaften und der schlecht kontrollierbaren Degradation ist Fibrin als Grundlage von Trägermatrices wenig empfehlenswert (*Frenkel und die Cesare, 2003*).

Alginat und Agarose, zwei Polysaccharide, erlauben durch ihren hohen Wassergehalt eine adäquate Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff hin zu den Zellen (*Söntjens et al., 2006*). Alginat begünstigt in vitro die Chondrogenese (*Hunziker, 2002*), ist jedoch wegen seiner eingeschränkten Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität weniger als Trägermaterial geeignet (*Wang et al., 2005*). So konnte *Hunziker (2002)* nach Transplantation der Matrix starke Fremdkörper- und immunologische Reaktionen aufzeigen.

Im Rahmen vieler Studien wurde bisher das Zellverhalten von Chondrocyten und mesenchymalen Stammzellen auf dem Trägermaterial Kollagen untersucht (*Nehrer et al., 1997*). Die natürliche adhäsive Oberfläche und die im Kollagen enthaltenen biologischen Informationen, die die Zellaktivität beeinflussen, fördern die Zellanheftung und deren Wachstum. Nach Implantation der Matrix sind keine Irritationen des umliegenden Gewebes bekannt, die Abbauprodukte sind physiologisch und daher kein Auslöser von immunologischen Reaktionen (*Stark et al., 2006*). De Franceschi et al., Willers et al. und Lubiatowski et al. konnten bei Trägermaterialien aus Kollagenen eine Stimulation zur Bildung von hyalinem Knorpel nachweisen, so dass sie dieses Trägermaterial als

empfehlenswert für die Füllung osteochondraler Defekte auswiesen (*De Franceschi et al., 2005; Willers et al., 2005; Lubiowski et al., 2006*). Nach Frenkel und Di Cesare kann durch die Implantation von mit Chondrozyten beladenen Kollagenmatrices die Bildung von hyalinem Knorpel stimuliert werden, der in den strukturellen und mechanischen Eigenschaften dem natürlichen Gewebe entspricht (*Frenkel und Di Cesare, 2003*). Die schnelle Degradationsrate, die alle physiologischen Materialien aufweisen, schränkt deren Benutzung jedoch ein (*Wang et al., 2005*).

Die Hyaluronsäure, ein Glykosaminoglykan der ECM des Knorpels, zeichnet sich durch ihre hervorragende Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit aus. Die notwendige mechanische Stabilität des Trägermaterials wird durch Esterbindungen und Quervernetzungen erreicht. Diese Modifizierung des Materials führt zu einer Herabsetzung der Biokompatibilität (*Goa und Benfield, 1994*) und stellt so einen entscheidenden Nachteil für den Einsatz von Hyaluronsäure dar. Allerdings kann durch dessen Verwendung für kultivierte Chondrozyten die Bildung von nativem hyalinartigen Knorpelgewebe induziert werden (*Nehrer et al., 2006*). Um die Nachteile natürlicher Trägermaterialien auszuschalten, finden diese oft in Form von Composites, also in Kombination mit anderen Materialien, Verwendung. Ausgiebige Materialforschungen in der eigenen Abteilung führten zur Entwicklung eines neuen, biodegradablen Biomaterials mit guter Biokompatibilität und spezifischen biologischen Eigenschaften (*Angele et al., 1998; Angele et al., 1999; Angele et al., 2004(1)*). Das porös aufgebaute Material besteht aus veresterter Hyaluronsäure und Gelantine, beides Derivate der ECM von Knorpel. Durch diese Derivatisierung wird ein zu schneller Abbau des Biomaterials durch körpereigene Enzyme verhindert, was zu ausreichender Anfangsstabilität für die Zellen führen soll. Die verzögerte Degradation der Matrix ermöglicht den Zellen so ausreichend Stabilität bis eigenes, autologes Reparaturgewebe die stützende Funktion übernimmt. Weder die Einzelkomponenten noch die Abbauprodukte der entwickelten Matrix zeigten Toxizität oder lösten immunologische Gewebereaktionen aus (*Angele et al., 1999; Campoccia et al., 1998*).

### 1.8 Fragestellung

Die Therapie degenerativer Krankheiten des Handgelenks, die mit osteochondralen Defekten einhergehen, wie es unter anderem beim Morbus Kienböck der Fall ist, wird aus verschiedenen Gründen erschwert. Generell können osteochondrale Defekte dieser Art durch

den eigenen Körper nicht ausreichend repariert werden und führen über längere Zeit zu einem Funktionsverlust des betroffenen Gelenkes. Trotz intensiver Forschung konnte bisher kein allgemein akzeptiertes Therapieverfahren gefunden werden. So bringen z.B. operative Verfahren, bei denen das Os lunatum durch Fremdmaterialien ersetzt wird, neben einigen Vorteilen zahlreiche Nachteile wie Bewegungseinschränkungen oder Begleitreaktionen mit sich.

Die Isolierung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus verschiedenen Ursprungsgeweben wurde Ende der 90er-Jahre beschrieben. Unterschiedliche Ansätze mit solchen Stammzellen eröffnen neue Perspektiven für die Behandlung von osteochondralen Defekten.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Kompositmatrices, bestehend aus Hyaluronsäure und Gelatine, mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark von New Zealand White Rabbits, beimpft. Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurden diese Matrices in einem definierten chondrogenem Differenzierungsmedium *in vitro* kultiviert. Zudem wurden Aggregate aus diesen Zellen formiert. Es folgte die anschließende histologische und immunhistochemische Untersuchung sowohl der Matrices, als auch der Aggregate, um die erfolgreiche Differenzierung beurteilen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden diese *in vitro* hergestellten, mit Stammzellen beladenen Matrices am Kleintiermodell untersucht. Hierzu wurden Ossa lunata der Handgelenke von New Zealand White Rabbits reseziert, um in den entstandenen Leerdefekt die Matrices zu setzen. Nach 2, 6 und 12 Wochen wurde das Gefäßsystem der Tiere mit einer speziellen Färbung dargestellt und anschließend die osteochondrale Defektheilung mittels radiologischer, histologischer und fluoreszenzmikroskopischer Analysen untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk auf den vaskulären Status gelegt wurde. In der Kontrollgruppe wurden zellfreie Matrices implantiert.

Die Untersuchungen im ersten Teil der Arbeit sollten zeigen, ob die chondrogene Differenzierung von multipotenten Stammzellen aus dem Knochenmark der Versuchstiere möglich ist. Dies sollte als Positivkontrolle für die *in vivo* Versuchsreihe dienen. Im *in vivo* Teil sollte der Einfluss der zellbeladenen Matrices im Bezug auf die osteochondrale Differenzierung und die Angiogenese in der Defektzone der Hasenhandgelenke genauer untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Axiom Aristos Multix FD	
Flachbilddetektorsystem	Siemens, Erlangen
Brutschrank CO2 Heracell 240	Heraeus, Hanau
Digitalfotokamera 5700	Nikon, Darmstadt
Einbettmulden	Kulzer&Co, Friedrichsdorf
Exakt-Lichtpolymerisationsgerät	Exakt-Gerätebau, Norderstedt
Exakt-Mikroschleifsystem	Exakt-Gerätebau, Norderstedt
Exakt-Präzisionsklebepresse	Exakt-Gerätebau, Norderstedt
Exakt-Trennschleifsystem	Exakt-Gerätebau, Norderstedt
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Mikroskope: Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Fluovort FU	Leitz, Wetzlar
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Operationsbesteck	Martin Medizin-Technik, Tuttlingen
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Pipetten, Costar Stripette	
(1/5/10/25/50 ml)	Corning, Corning USA
Pipettenspitzen epTips filter	
(10/100/250/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plexiglasobjektträger	Kulzer&Co, Friedrichsdorf
Polypropylenzentrifugenröhrchen	NeoLab, Heidelberg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Präzisionswaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler IKA- Vibrax- VXR	IKA Labortechnik, Staufen
Skalpelle (Nr. 11/21)	Feather, Köln
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen



Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Waage EG 600-2M	Kern, Balingen-Frommern
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserbad WB 10	Memmert, Schwabach
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (24-Well)	Falcon, Heidelberg
Zentrifugen: Multifuge 3S	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15ml/50ml)	Falcon, Heidelberg

### 2.1.2 Medien und Lösungen

#### *Chemikalien und Reagenzien*

Berliner Blau	Chroma, Stuttgart
Diaminobenzidine 3,3` (DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
DePex	Serva, Heidelberg
Gelatine von Porcine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin	Fluka, Buchs, Schweiz
Technovit 7200 VLC ® Einbettmedium	Kulzer&Co, Friedrichsdorf
Technovit 7210 VLC ® Präzisionskleber	Kulzer&Co, Friedrichsdorf
Technovit 7100 VLC ® Härter	Kulzer&Co, Friedrichsdorf
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
ToluidineBlue O	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X – 100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin 1% EDTA	Gibco, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a.

### *Antikörper und Enzyme*

Aggrecan	Chemicon, Tenecula, USA
Anti-Collagen Type I Mouse IgG	Dianova, Hamburg
Anti-Collagen Type II Mouse IgG	Dianova, Hamburg
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse IgG	Dianova, Hamburg

Die primären Antikörper wiesen eine bekannte Kreuzreaktion gegen Rabbit auf.

### *Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren*

Fetal Bovine Serum	Gibco, Karlsruhe
Goat Serum	Dako, Hamburg
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco`s Modifies Eagle Medium (DMEM) low glucose	Gibco, Karlsruhe
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe

### *Für mesenchymale Stammzellkulturen (MSC-Medium):*

Low Glucose DMEM (1g/l), 10 % FCS nicht hitzeinaktiviert, 1% Hepes Puffer, 1% Pen/Strep

*Chondrogenes Differenzierungsmedium*

High Glucose DMEM (4,5 g/l), 1% Sodium-Pyruvat, 1% IST +3, 1% Dexamethason, 0,5% TGF- $\beta$ <sub>1</sub> recombinant, 1% Ascorbinsäure;

*Kits*

ABC – Kit

Vectorlabs, Burlingame

*Adhäsions- und Wachstumsfaktoren*

Dexamethason

Sigma Aldrich, Steinheim

ITS +3

Sigma Aldrich, Steinheim

Transforming Growth Factor- $\mu$ 1

R&D Systems, Wiesbaden

L-Ascorbic Acid-2-Phosphat

0,1024g Ascorbinsäure, 20ml Tyrodes  
Lösung

Dexamethason (Stock)

0,00392g Dexamethason in 10ml  
100% Ethanol

Dexamethason (Gebrauch)

200  $\mu$ l Stocklösung, 19,8ml DMEM  
Low Glucose

*Puffer und Lösungen*

Blockingpuffer für Immunhistochemie

60 ml Aqua.dest.  
120 ml Tris 0,2M (0,08 M)  
2400 mg NaCL (0,8%)  
450 mg Timerosal (0,15%)  
60 ml Triton 4% (0,8%)  
30 ml Ziegenserum (10%)  
30 ml FCS (10%)

Berliner – Blau - Gelatine – Lösung	25 g Berliner Blau 50 ml Glycerin 25 g Blattgelatine in 500 ml Aqua dest. lösen
Ehrlich`s Reagenz	15 g p- Dimethylaminobenzaldehyd 100 ml n-Propanol/Perchlorsäure (2:1 v/v)
DAB Stammlösung 10 x	0,5% Diaminobenzidin in 0,1% BSA
DAB Arbeitslösung	200 µl DAB/BSA 1800 µl 0,1 M mPBS 80 µl Ni/Co 6 µl 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (direkt vor Verwendung)
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
Ni/Co Lösung (für DAB Arbeitslösung)	100 mg NiCl <sub>2</sub> 5 mg CoCl <sub>2</sub> 10 mg BSA 10 ml H <sub>2</sub> O
m-PBS Puffer (1M)	47,2 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O 6,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 36,0 g NaCl mit Aqua dest. auf 500g auffüllen ph zwischen 7,0 und 7,4
Paraformaldehydlösung (Standartfixans)	4 g Paraformaldehyd 50 ml Phosphatpuffer (0,2M) 50 ml Aqua dest.

PBS	150 mM NaCl 8 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ph 7,3
Phosphatpuffer 0,2M	Dinatriumhydrogenphosphat 5 Teile Natriumdihydrogenphosphat 1 Teil pH 7,4
Toluidinblaufärbelösung	0,1 g Toluidinblau in 100 ml bidest. Wasser
Trispuffer 0,2 M	24,228 g Tris 1000 ml Aqua dest. mit HCl auf pH 7 einstellen
Tris-Waschpuffer für Immunhistochemie	780 ml Tris 0,2M 2220 ml Aqua dest. 24,96 g NaCl 1200 µl Triton 4% gesamt 3000 ml
Pepsinlösung 0,1%	1 mg Pepsin in 1 ml McIlvaine Puffer (0,1M Zitronensäure, 0,2M Dinatrium- Hydrogenphosphat) pH 3,6
Phenylhydrazin-Lösung	200 ml Waschpuffer ohne Triton 4 mg Phenylhydrazin (Lösung 1) 100 ml von Lösung 1 mit 30 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6% (Lösung 2)

### *Medikamente*

Heparin	Liquemin, Roche, Grenzach-Wyhlen
Baytril 10%	Bayer Vital, Leverkusen
Braunovidonsalbe	B. Braun, Melsungen
Ketamin 10%	WDT, Garbsen
Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos
Novaminsulfon-Tropfen	Ratiopharm, Ulm
Vetranquil 1%	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf
Xylazin 2%	Serumwerk, Brenberg

### *Vitalfarbstoffe*

Alizerin Red Komplex	Merck, Darmstadt
Calcein Green	Merck, Darmstadt
Xylenol Orange	Merck, Darmstadt

Um eine optimale Applikationsform zu erreichen, wurden die genannten Farbstoffe unter speziellen Bedingungen aufgelöst. Xylenol Orange und Calcein Green wurden in jeweils 50 ml PBS gelöst. Alizerin Red Komplexon konnte mit 50 ml Aqua dest. und 1g NaHCO<sub>3</sub> in Lösung gebracht werden.

#### 2.1.3 Matrices

Die verwendeten Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Kompositsmatrices wurden vor jedem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch nach einem patentierten Herstellungsverfahren frisch hergestellt. Das Hyaluronan-Gelantine-Verhältnis betrug sowohl für die *in vivo*, als auch für die *in vitro* Testungen, stets 70% zu 30%.

Die Hyaluronkomponente wurde kommerziell als Produkt Jaloskin® (Fidia Advanced Biopolymers) erworben, hydrolisiertes Kollagen der Firma Sigma (Pig, G1890) stellte die Gelatine-Komponente dar. Beide Komponenten wurden gemeinsam gelöst und in spongiöse Scheiben umgewandelt. Die Porengröße der Trägermatrices betrug 350 - 450 µm, deren

Abmessungen beliefen sich auf 4x5x2 mm, was in etwa der Größe des Os lunatum der Versuchstiere entsprach. Vor Versuchsbeginn erfolgte die Sterilisation der Matrices mit Gammastrahlen.

#### 2.1.4 Tiere

New Zealand White Rabbits (2,5 - 3,5 kg)

Harlan und Winkelmann, Borcheln

Für die Tierversuche wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Befunde männliche New Zealand White Rabbits verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall der Universität Regensburg unter den unten aufgeführten, für Nager optimalen Bedingungen.

- Temperatur  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 5\%$
- Hell-Dunkel-Intervall 12 h
- freier Zugang zu Standardfutter und Wasser

Sämtliche Tierversuche wurden von der Regierung der Oberpfalz genehmigt und gemäß den geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen der New Zealand White Rabbits

Die mesenchymalen Stammzellen wurden für die Versuchsreihen aus dem Knochenmark von New Zealand White Rabbits gewonnen. Zu diesem Zweck wurden die Hasen mit einer Mixtur von 0,6 ml/kg Körpergewicht aus Ketamin 10% und Xylazin 2% narkotisiert. Nach Rasur der Beckenkämme, Lagerung der Kaninchen in Bauchlage und sterilem Abdecken, erfolgte beidseits auf Höhe der Spinae iliacae posteriores superiores die Inzision der Haut auf ca. 1 cm Länge und nach Spalten der Faszie die Darstellung des Beckenkamms. Die Knochenmarkhöhle wurde mit einer 16 gauge Nadel eröffnet und jeweils 4-6 ml Knochenmark pro Beckenkamm mit einer heparinisierten Spritze aspiriert. Nach dem

Faszienschluss wurde die Haut mit resorbierbarem, atraumatischem Fadenmaterial der Stärke 4,0 vernäht.

Nach oben beschriebener Entnahme des Knochenmarks erfolgte die sofortige Bearbeitung und Kultivierung der Zellen, wobei zuerst chondrogenes Kulturmedium, zusammengesetzt aus DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) low glucose, 10% FBS (fötales Rinderserum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer, zugegeben wurde. Danach erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 1700 rpm und das anschließende Absaugen des Überstandes, der sich über dem Zellpellet bildete. Nach Resuspendieren der Zellen wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer deren Anzahl, errechnet aus unten stehender Formel, ermittelt:

$$N = Z \cdot X \cdot 10^4,$$

wobei Z die Zellzahl, X den Verdünnungsfaktor und die Zahl  $10^4$  den Kammerfaktor darstellten. Anschließend konnten jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen auf eine  $25 \text{ cm}^2$  Kulturflasche ausgebracht und mit jeweils 15 ml Kulturmedium versetzt werden.

Die mesenchymalen Stammzellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  bei zweimaligem Mediumwechsel in der Woche im Brutschrank kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80% erreichten, was in etwa einen Zeitraum von 21 Tagen erforderte.

### 2.2.2 Besetzen der Matrices mit mesenchymalen Stammzellen, Herstellung von Zellaggregaten und chondrogene Differenzierung

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80% erreichten, wurden sie vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Das Kulturmedium wurde abpipettiert und die Zellschicht vollständig mit 5ml Trypsin 1% bedeckt. Bei  $37^\circ\text{C}$  und fünf-minütiger Inkubationszeit waren die Zellen komplett vom Flaschenboden abgelöst und die enzymatische Reaktion wurde mit 10 ml serumhaltigem Kulturmedium abgestoppt. Die Zell-Medium-Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Zellzahl in der Neubauerzählkammer nach oben stehender Formel ermittelt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die nun hochkonzentrierte Zellsuspension mit etwa  $20 \mu\text{l}$  Aggregatkulturmedium, welches sich aus DMEM high-glucose-medium, 1% Pyruvat, 1% IST, 1% Dexamethason, 1% Ascorbinsäure und 0,5% TGF- $\beta$ zusammensetzte, resuspendiert.



Im Anschluss wurden 4-5 Millionen Zellen mit einer 10 µl Pipettenspitze in das Zentrum der ca. 4x5x2 mm großen Matrices injiziert. Sowohl für die *in vitro*, als auch für die *in vivo* Versuche wurden ausschließlich die in unserem Labor entwickelten biodegradablen Matrices auf Hyaluronsäure-Gelatine-Basis verwendet.

Nach Überführung der Zell-Matrixkonstrukte in eine 24-Well Zellkulturschale und einstündiger Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank, erfolgte die vorsichtige Zugabe von 2 ml Aggregatmedium, welches dreimal pro Woche gewechselt wurde. Anschließend erfolgte die weitere Analytik oder die Überführung der Matrices in die Os lunatum-Defekte der Kaninchenhandgelenke.

### 2.2.3 *In vitro* Chondrogenesemodell

Aus einem weiteren Teil der mesenchymalen Stammzellen wurden Zellaggregate erstellt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach erreichter Konfluenz wie oben beschrieben abtrypsiniert, gezählt und jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in je eine Kammer einer 48-Well Kulturschale überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen mit 1000 rpm für 10 min und das vorsichtige Absaugen des Kulturmediums, das sich über den entstandenen Pellets befand. Diesen wurden im nächsten Schritt jeweils 35µl Differenzierungsmedium zugeführt, woraufhin die Kultivierung der dreidimensionalen Aggregate bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank bei dreimaligem Mediumwechsel pro Woche für einen Zeitraum von 21 Tagen erfolgte.

Das Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Stammzellen in den Matrices und in Aggregatform wurde mit Hilfe eines *in vitro* Chondrogenesemodells untersucht. Hierzu wurden diese 21 Tage lang im definierten oben beschriebenen Differenzierungsmedium kultiviert, wobei der Mediumwechsel dreimal wöchentlich stattfand. Anschließend erfolgte die histologische und immunhistochemische Analyse der Proben.

Alle zellbeladenen Matrices und Aggregate der *in vitro* Testung wurden auf die gleiche Art und Weise fixiert und histologisch aufgearbeitet. Als Fixierungslösung diente jeweils 1 ml Paraformaldehydlösung, versetzt mit 1 µl Glutaraldehyd, in welches die Proben nach dreiwöchiger Kultivierung für 1 Stunde eingelegt wurden. Anschließend erfolgte die Überführung in Standardfixans ohne Glutaraldehyd für jeweils 3 h und das Auswaschen und Puffern in 0,1M Phosphatpuffer für 1 h. Die Proben wurden im Anschluss für jeweils 1 h in Saccharoselösungen mit aufsteigenden Konzentrationen (10%, 20%, 30%, 40%) inkubiert.

Nach Zugabe von reinem TissueTek und einer weiteren Inkubationszeit von 60 Minuten konnten die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und weiter verarbeitet werden. Gefrierschnitte der Dicke 10 µm wurden mit einem Gefrierschnittmikrotom angefertigt und nach Aufziehen auf Objektträger unterschiedlich gefärbt und ausgewertet.

### *Toluidinblaufärbung*

Nach dem Spülen der Präparate mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 1 Minute mit Färbelösung, welche sich folgendermaßen zusammensetzte, überschichtet:

- Lösung von 1,0 g Toluidinblau O in 100 ml Aqua dest., 6 Teile
- Lösung von 2,5 g Natriumkarbonat in 100 ml Aqua dest., 3 Teile
- 70% Äthylalkohol, 1 Teil
- Verdünnung der Färbelösung mit Aqua dest. 1:1

### *Immunhistochemie, Kollagen Typ II*

- Waschen der Präparate im Tris - Waschpuffer für 3x10 Minuten
- Andau mit Pepsinlösung für 15 Minuten
- Waschen mit Blockingpuffer für 30 Minuten
- Inkubation der Präparate mit Primärantikörper im Blockingpuffer über Nacht
- Waschen der Präparate mit Tris-Waschpuffer 3x10 Minuten
- Verstärkung der primären Antigen-Antikörper-Reaktion durch 60-minütige Inkubation mit Sekundärantikörper
- Waschen der Präparate mit Tris-Waschpuffer 3x10 Minuten
- Absättigung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit Phenylhydrazinlösung für 10 Minuten
- Waschen der Präparate mit Tris-Waschpuffer 3x10 Minuten
- Inkubation für 60 Minuten mit Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexen (ABC-Kit)
- Waschen der Präparate mit Tris-Waschpuffer 3x10 Minuten
- Entwickeln mit DAB-Arbeitslösung
- Waschen der Präparate mit Tris-Waschpuffer 3x10 Minuten

- Dehydrierung in aufsteigender Propanolreihe und Xylol
- Eindeckeln der Präparate mit DePex

### 2.2.4 Tierversuch: in vivo Analyse am Os lunatum Defekt

#### 2.2.4.1 Tier Operationen

Nach Anästhesie der New Zealand White Rabbits mit einer Mixtur von 0,6 ml/kg KG Ketamin 10% und Xylazin 2% als Muskelrelaxans, sowie 0,25 ml Vetranquil mittels glutealer i.m. Injektion, wurden deren Handgelenk rasiert. Die Kaninchen wurden anschließend in Bauchlage unter einer Wärmelampe positioniert. Es erfolgte die Injektion von 0,4 ml Baytril, gelöst in 15 ml Ringerlösung, in den nuchalen Fettkörper der Tiere und das sterile Abdecken des OP-Gebiets (Abb.5). Ein ca. 2 cm langer Hautschnitt erfolgte dorsal über dem Handgelenk in Verlängerung des Os metacarpale III. Nach Darstellung der Streckersehnen und Schonung derer durch einen Haltefaden wurde die Gelenkkapsel eröffnet und der darunterliegende Fettkörper partiell reseziert. Die Handwurzelknochen wurden dargestellt und das Os lunatum von umgebendem Gewebe gelöst und komplett reseziert.

Der entstandene Defekt wurde nach ausgiebiger Gelenkspülung mit NaCl wie folgt bestückt:

- 1) Am rechten Handgelenk der Tiere erfolgte die Defektfüllung mit einer zellfreien Matrix (Kontrollgruppe).
- 2) Am linken Handgelenk erfolgte die Defektfüllung mit einer Matrix, die mit mesenchymalen Stammzellen besetzt und über einen Zeitraum von 21 Tagen im Differenzierungsmedium vorkultiviert wurde.

Hierbei wurden die Matrices mit einer sterilen Pinzette vorsichtig aus der Zellkulturschale herausgenommen und unter leichtem Druck in den entstandenen Leerdefekt eingepasst. Die Einteilung der Versuchsgruppen wurde wie in Tabelle 2 gezeigt vorgenommen.

	<b>Linkes Handgelenk</b>	<b>Rechtes Handgelenk</b>
<b>1 Wochen</b> <b>n = 8</b>	Zell-Matrix-Konstrukt	Leermatrix
<b>6 Wochen</b> <b>n = 8</b>	Zell-Matrix-Konstrukt	Leermatrix
<b>12 Wochen</b> <b>n = 8</b>	Zell-Matrix-Konstrukt	Leermatrix

**Tab. 2:** Versuchsgruppeneinteilung

Nach Einpassung der Matrices erfolgte der Verschluss der Gelenkkapsel und der Hautverschluss durch Primärnaht mit resorbierbarem Nahtmaterial der Stärke 4,0. Braunovidonsalbe wurde als lokales Antiseptikum aufgetragen. Die Wunde wurde im Anschluss sowohl mit einem Sprühverband als auch mit einem Pflaster verschlossen. Postoperativ wurden die Tiere einmalig mit 20 ml Ringerlösung als Stoffwechselstimulanz und Flüssigkeitsreserve, sowie mit 0,25 ml Novalgin (in der Infusion gelöst) zur Analgesie versorgt. Die Tiere konnten postoperativ ihre Gelenke insoweit belasten, wie sie es selbst tolerierten. Wasser und Futter standen im Verlauf ad libitum zur Verfügung.



**Abb. 5:** steril abgedeckter OP-Situs

#### 2.2.4.2 Polychrome Fluoreszenzmarkierung

Zur qualitativen und semiquantitativen Auswertung der Knochenneubildung wurden den Kaninchen mit sechs und 12 Wochen Laufzeit drei verschiedene Vitalfarbstoffe (Xylenol Orange, Calcein Green und Alizerin Red) zu unterschiedlichen Zeitpunkten subcutan injiziert. Vor der Applikation wurden alle Stoffe in Lösung gebracht (siehe 2.1.2) und steril filtriert, da sie keine Hitzesterilisation tolerieren (*Romeis und Böck, 1989*). Bei der Injektion der Substanzen wurde darauf geachtet, möglichst verschiedene Punktionsorte zu wählen, um eine optimal Resorption der Farbstoffe zu erreichen.

Vitalfarbstoffe lagern sich als Komplexbildner an Calcium-Ionen an. Liegen zwischen den einzelnen Injektionen mehr als 24 Stunden können in der Histologie getrennte, fluoreszierende Banden als Ausdruck eines appositionellen Knochenwachstums beobachtet werden (*Romeis und Böck, 1989*). Dies führte zu in Tab. 3 gezeigtem Injektionsschema.

Injektionstag	Vitalfarbstoff	Dosierung
<b>7. und 12. postoperativer Tag (6 Wochen)</b> <b>30. und 35. postoperativer Tag (12 Wochen)</b>	Xylenol Orange	90 mg/kg KG
<b>17. und 22. postoperativer Tag (6 Wochen)</b> <b>40. und 45. postoperativer Tag (12 Wochen)</b>	Calcein Green	10 mg/kg KG
<b>27. und 32. postoperativer Tag (6 Wochen)</b> <b>50. und 55. postoperativer Tag (12 Wochen)</b>	Alizerin red	30 mg/kg KG

**Tab. 3:** Injektionsschema der Vitalfarbstoffe bei Tieren mit 6 und 12 Wochen Versuchslaufzeit

#### 2.2.4.3 Röntgenologische Untersuchungen

Alle Tiere wurden einen Tag postoperativ, sowie kurz vor Versuchsende einer radiologischen Röntgendiagnostik unterzogen. Es wurde jeweils Standardaufnahmen des rechten und linken Handgelenks der Hasen im anterioren-posterioren Strahlengang angefertigt.

#### 2.2.4.4 Gewinnung der Präparate

Nach Ende der Versuchslaufzeit wurden die Tiere nach oben beschriebenem Schema erneut narkotisiert, in Bauchlage gelagert, durch Injektion der Ohrvene mit 5000 i.e. Heparin vollheparinisiert und mittels 0,4 ml Narcoren i.v. getötet. Die vorderen Extremitäten der New Zealand White Rabbits wurden auf Höhe des Schultergelenkes abgetrennt und in heißes Wasser gelegt, um eine Dilatation der Gefäße zu erreichen. Mit einer 22 gauge Venenverweilkanüle wurde die Arteria brachialis punktiert und die Pfote mit 60 ml erwärmten Phosphatpuffer (0,1M) perfundiert. Anschließend erfolgte die Perfusion des Gefäßsystems mit 150 ml Paraformaldehydlösung zur Fixierung und ein erneutes Spülen mit Puffer, wobei die Pfote hierzu in heißes Wasser gebracht wurde. Abschließend wurde die Perfusion mit einer erwärmten Berliner-Blau-Gelatine-Färbelösung durchgeführt und die

Pfote dann für 15 Minuten in Eiswasser gelegt, um das Aushärten der Gelatine zu gewährleisten. Die Weichteilgewebe wurden abpräpariert, das Handgelenk herausgelöst und zur Fixierung drei Tage lang in Paraformaldehydlösung überführt. Die weitere Verarbeitung und histologische Auswertung der Präparate erfolgte nach unten beschriebener Einbettung in Kunststoff (2.2.5).

### 2.2.4.5 Histologie und Immunhistochemie

Nach Herauslösen und Fixierung der Hasenpfoten erfolgte die Einbettung in Technovit 7200 VLC® zur histologischen Bearbeitung und Auswertung. Die Präparate wurden in steigender Alkoholreihe entwässert und gemäß dem in Tab. 4 dargestellten Protokoll behandelt. Sowohl die Entwässerung, als auch die Durchtränkung der Proben mit Kunststoff wurde bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung durchgeführt. Die Einbettung und Polymerisation der kunsthazinfiltrierten Proben erfolgte in lichtdurchlässigen Einbettmulden, in die die Pfoten mit dem Fixationskleber Technovit 7230 VLC® festgehalten wurden, um das Anheben vom Boden zu verhindern. Nach Übersichtung mit reinem Einbettmedium, versetzt mit dem Härter Technovit 7100®, erfolgt die Polymerisation in 2 Stufen. Initial erfolgte eine langsame Einleitung der Polymerisation bei großem Lampenabstand zur Vermeidung von Spannungsrissen für etwa eine Stunde. Die komplette Aushärtung bei Lampenlicht im Wellenlängenbereich von 400-500 nm im Polymerisationsgerät unter 60°C konnte nach 22 h erreicht werden. Nach der Polymerisation des Einbettmediums wurden die Präparate mittels der Trenn-Dünnschleiftechnik nach Donath bearbeitet (*Donath und Breuner, 1982*). Die Präparate wurden mittels eines Sekundenklebers auf Cyanoacrylatbasis (Technovit 7210 VLC®) auf einen Plexiglasobjektträger geklebt. Nach Herstellen einer planparallelen Fläche mit dem Mikroschleifsystem wurde auf diese ein zweiter Objektträger geklebt und mit der Präzisionsklebepresse zusammengedrückt. Das Präparat wurde in die Vakuumhalterung des Trennschleifsystems eingespannt, ein circa 150 µm dicker Schnitt abgeschliffen und dieser mit dem Mikroschleifsystem poliert. Mit den Schnitten wurden nach unten aufgeführtem Protokoll Färbungen mit Toluidinblau durchgeführt. Zudem wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, um den Prozess der möglichen Knochenformation durch die injizierten Vitalfarbstoffe darzustellen.

<b>Schritt</b>	<b>Flüssigkeit</b>	<b>Konz.</b>	<b>Zeit</b>
<b>1</b>	Ethanol	50 %	3 d
<b>2</b>	Ethanol	70 %	3d
<b>3</b>	Ethanol	90 %	3d
<b>4</b>	Ethanol	96 %	3d
<b>5</b>	Ethanol	100 %	3d
<b>6</b>	Technovit VLC 7200®	30 %	3d
<b>7</b>	Technovit VLC 7200®	50 %	3d
<b>8</b>	Technovit VLC 7200®	70 %	3d
<b>9</b>	Technovit VLC 7200®	100 %	3d
<b>10</b>	Technovit VLC 7200® + Härter Technovit 7100® (1g /100ml)	100%	7d

**Tab. 4:** Protokoll zur Entwässerung und Durchtränkung der Präparate mit Methylmetacrylat



### *Toluidin Blau*

- Reinigung der Schnitte mit einem Aceton-Ethanol (1:1)
- Inkubation der Schnitte in 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Bewegung
- Spülen mit Aqua dest.
- Übersichtung mit Toluidinblau-Färbelösung für 15 Minuten
- Spülen mit Aqua dest.
- Differenzierung mit Aceton-Ethanol (1:1)
- Trocknen der Schnitte
- Eindeckeln mit Technovit 7200 VLC®

### *Fluoreszenzmikroskopie*

Sämtliche Fluoreszenzuntersuchungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 EB von Leitz durchgeführt. Um die jeweilige Fluorochromemission zu untersuchen, wurden die dafür vorgesehenen Filter für das Anregungslicht des Mikroskops verwendet (blauer, grüner und roter Filter). Bei jedem Präparat wurde das 4fach- Objektiv verwendet. Optimale Fluoreszenzanregungen konnten durch eine Belichtungs-Zeit (exposure) von 1/3 s und einer Verstärkung (gain) von 2,00x erzielt werden. Die Photographie wurde mittels eines integrierten Digitalfotoapparats durchgeführt. Die Nachbearbeitung erfolgte mit *Photoshop®* (2007) von *Adobe*. Hierbei wurden je drei identische Bildausschnitte der verschiedenen Filterstufen in ein leeres RGB-Bild kopiert. Über Änderungen der Deckkraft der einzelnen Farbkanäle konnte ein homogenes Bild erzeugt werden, das verschiedene fluoreszierende Banden als Ausdruck des appositionellen Knochenwachstums zeigte.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zellkultivierung

Mesenchymale Stammzellen der Versuchstiere wurden aus Knochenmarkaspiraten aus dem Beckenkamm gewonnen und nach Zentrifugation in Zellkulturflaschen ausgesät. Durch Mediumwechsel am achten Tag konnten alle Zellen, die nicht am Kulturflaschenboden adhärten, wie z.B. Erythrozyten oder abgestorbene Stammzellen, entfernt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren auf dem Boden bereits fibroblastenartige Zellen sichtbar. Diese ordneten sich wirbelartig in großflächigen Zellclustern an und zeigten somit den typischen Phänotyp mesenchymaler Stammzellen auf (Abb. 6). Weitere Kultivierung führte zu progredienter Proliferation der Zellen. Nach 10-14 Tagen mit regelmäßigem Mediumwechsel wurde eine Zellkonfluenz von etwa 80% erreicht. Homogene, fibroblastenartige Zellpopulationen mit mitotischen Aktivitäten waren sichtbar, so dass die Zellen anschließend zu Aggregaten weiterverarbeitet oder auf Matrices aufgebracht werden konnten.



**Abb. 6:** Lichtmikroskopisches Bild: MSC in 80 % Konfluenz mit fibroblastenartiger Zellpopulation (10x).

### 3.2 Differenzierungsverhalten *in vitro*

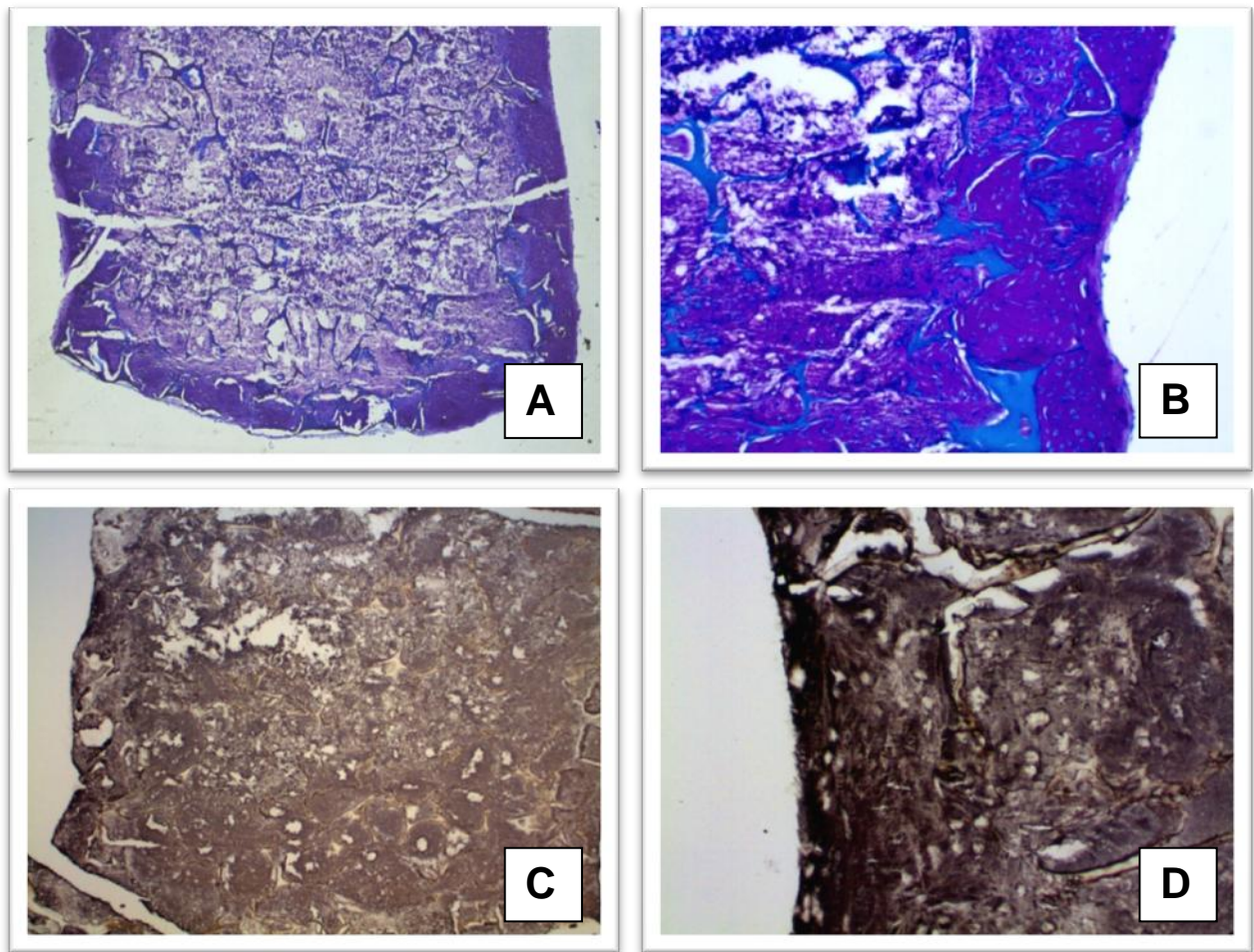
#### *Matrices*

Die zellbeladenen Matrices zeigten nach 21 Tagen Kultivierung im chondrogenen Differenzierungsmedium eine positive metachromatische Färbung mit Toluidin Blau als Zeichen der Bildung einer proteoglykanreichen extrazellulären Matrix. Hierbei konnte ein verstärktes Anfärben der Randzonen erkannt werden. Diese stellten sich auch in der immunhistochemischen Kollagen-II-Färbung als verstärkt positiv dar, jedoch auch in der Innenzone der Matrices ließ sich eine positive Kollagen-II-Färbung nachweisen. Eine Kreuzreaktion zwischen dem Antikörper und der Matrix zeigte sich nicht. Durch die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen konnte das entstandene Gewebe so als knorpelähnlich detektiert werden, eine Differenzierung fand statt (Abb. 7, A-D).

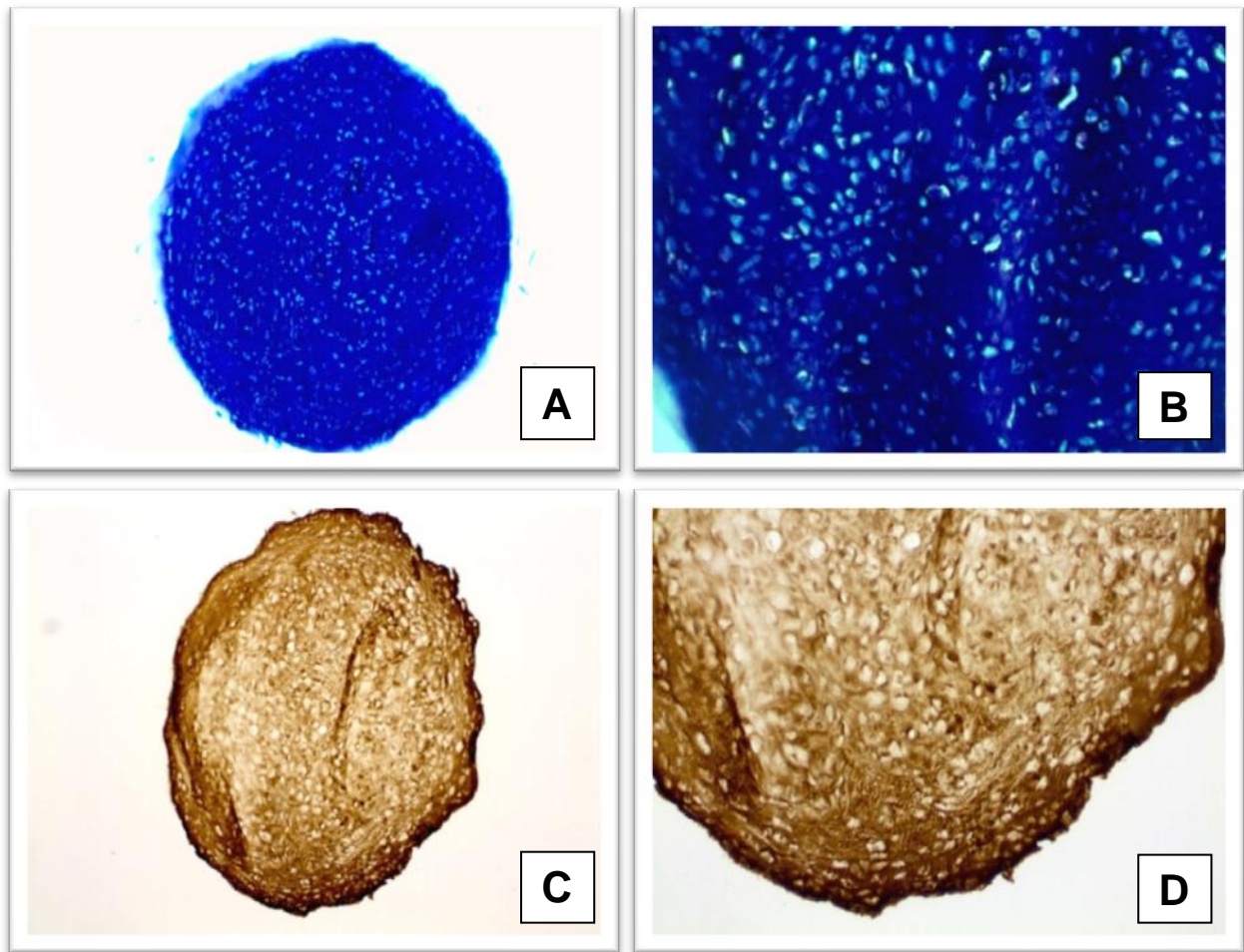
Die Matrix selbst erwies sich nach 21 Tagen als partiell noch erkennbar, jedoch degradiert. Auffallend war ein makroskopisch wahrnehmbares Quellverhalten der Matrices nach Beladung mit Zellen und 21 Tagen Vorkultivierung, welches sich in einer Größenzunahme um das 1,5-fache zeigte.

#### *Aggregate*

Die Zellaggregate zeigten nach 21 Tagen Kultivierung im chondrogenen Differenzierungsmedium nach Anfärben mit Toluidinblau eine starke Blaufärbung als Zeichen eines hohen Proteoglykangehalts der extrazellulären Matrix. Zudem konnte eine positive Reaktion für die immunhistochemische Färbung mit Kollagen Typ II, als wichtigsten Marker des hyalinen Gelenkknorpels, erreicht werden. Erneut konnte ein stärker positives Ergebnis am Randbereich der Aggregate erkannt werden (Abb. 8, A-D).



**Abb. 7 (A-D):** Histologische Schnitte von zellbeladenen Kompositmatrices nach Inkubation in chondrogenem Medium für 21 Tage **A-B:** Die Matrices zeigen eine positive metachromatische Färbung mit Toluidin-Blau als Zeichen für das Vorhandensein von proteoglykanreicher extrazellulärer Matrix. **C-D:** Die chondrogene Differenzierung wurde zudem durch immunohistochemische Färbungen mit Kollagen II gezeigt. (Vergrößerungen : A x4; C x10; B und D x20)



**Abb. 8, A-D:** Histologische Schnitte von Aggregaten mesenchymaler Stammzellen nach 21 Tagen Kultivierung in chondrogenem Medium. **A-B:** Die Aggregate zeigen eine starke Anfärbung der extrazellulären Matrix als Zeichen der Metachromasie in der Toluidin-Blau-Färbung. **B-C:** Die positive Anfärbbarkeit von Kollagen II detektiert eine chondrogene Differenzierung der Stammzellen. (Vergrößerungen: A und C x10; B und D x20)

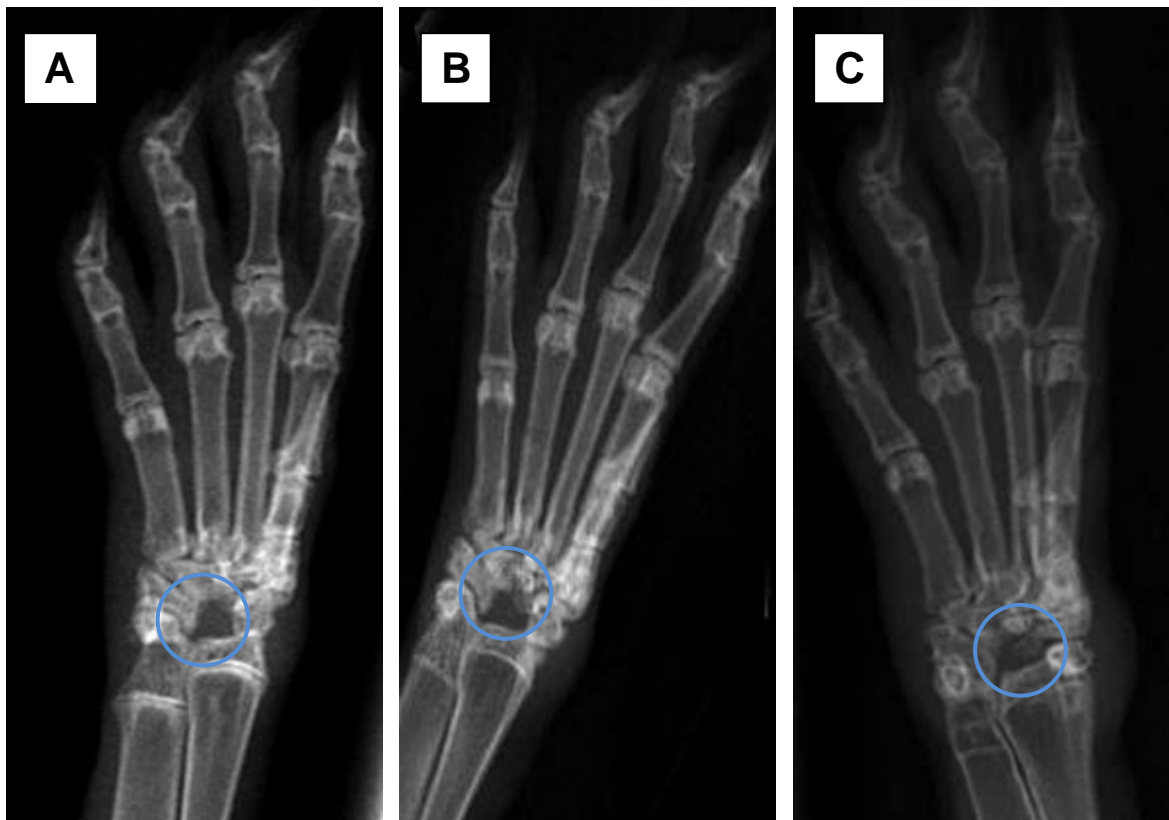
### 3.3 Tierversuche

#### 3.3.1 Radiologische Auswertung

Nach Einsetzen der zellbeladenen Matrices bzw. der Leermatrices in die Leerdefekte, wurde von allen Versuchstieren einen Tag postoperativ eine standard anterior-posteriore Röntgenaufnahme des Handgelenks gemacht. Dadurch sollte eine Resektion des Os lunatum in toto gezeigt werden. In allen Röntgenaufnahmen zeigte sich eine komplette Resektion der Ossa lunata. Die zweite röntgenologische Untersuchung erfolgte einen Tag prämortem, also nach 2, 6 oder 12 Wochen Versuchslaufzeit. Die rechten Handgelenke aller Versuchstiere, in deren Defektstelle eine zellfreie Matrix implantiert worden war, zeigten radiologisch keinen



Nachweis von neugebildeter Knochenformation. Ebenso konnte in den linken Handgelenken der Tiere mit 2 und 6 Wochen Laufzeit, deren Lunatum Defekt durch eine zellbeladene Matrix gefüllt worden war, radiologisch kein Knochengewebe detektiert werden (Abb. 9, A und B). 12 Wochen nach Implantation einer zellbeladenen Matrix zeigten sich hingegen mineralisierte und somit röntgendichte Strukturen im Regenerationsgewebe (Abb. 9, C).



**Abb. 9, A-C:** Standard anterior-posterior Röntgenaufnahmen der linken Handgelenke der Versuchstiere nach zwei (A) und sechs (B) Wochen Versuchslaufzeit. Bei keinem der Versuchstiere konnte Knochengewebe detektiert werden. Abbildung C zeigt ein Hasenhandgelenk nach Exzision des Os lunatum und Implantation einer zellbeladenen Matrix nach 12 Wochen Laufzeit. Neu gebildetes Knochengewebe konnte im Regenerationsgewebe im Bereich des ehemaligen Defektes gesehen werden.

### 3.3.2 Histologische Ergebnisse der Kontrollgruppen

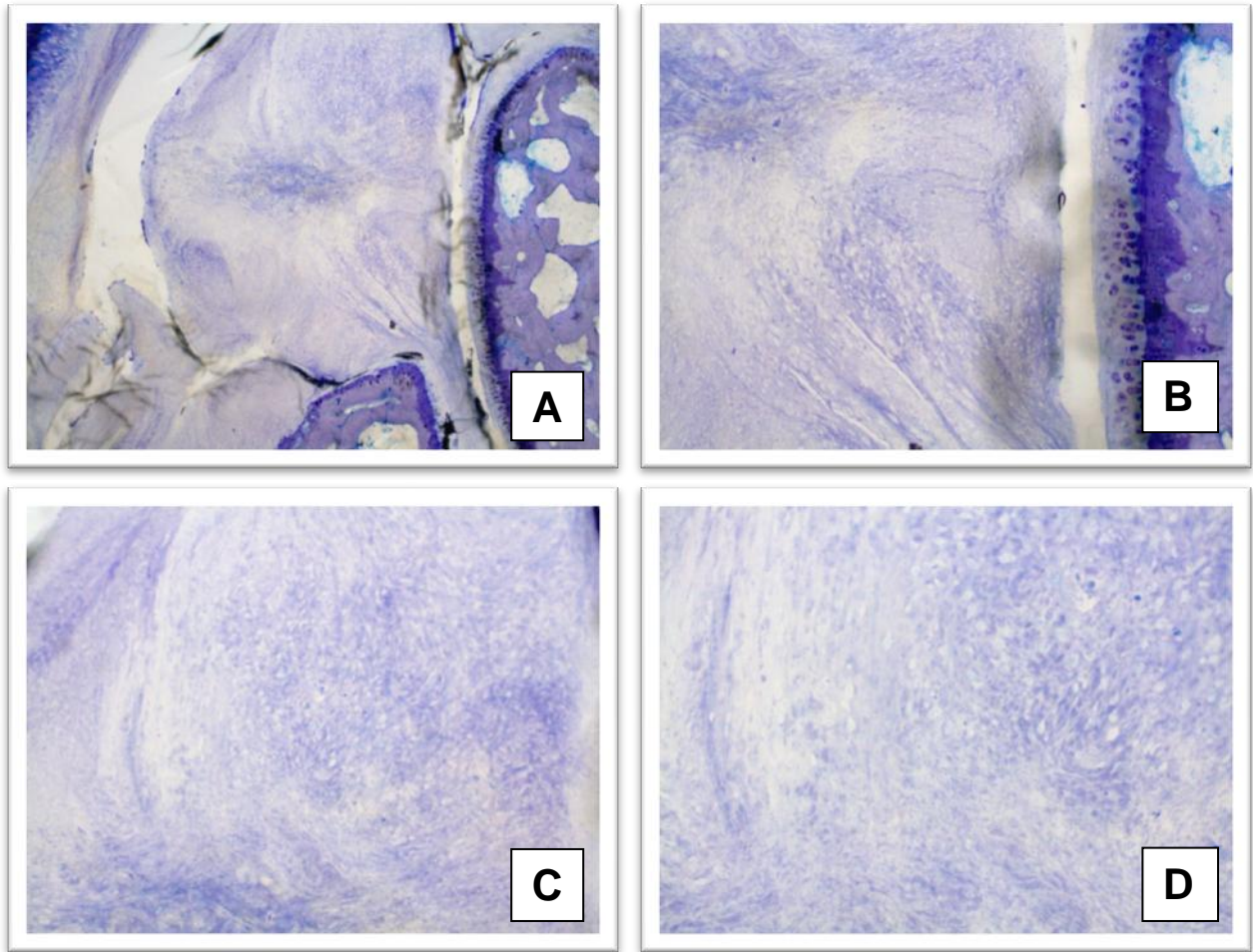
Abbildungen 10 A-D zeigen die histologischen Ergebnisse der Kontrollgruppen, deren Ossa lunata reseziert und in den entstandenen Defekt eine Leermatrix eingebracht wurde.

Die Matrix selbst ist bei den Versuchstieren mit 6 und 12 Wochen Versuchslaufzeit degradiert und aufgelöst, Reste der zellfreien Matrix können lichtmikroskopisch lediglich nach 2 Wochen gezeigt werden.

In der Toluidin-Blau Färbung ist nach 2 Wochen eine partielle Füllung des Defektes zu erkennen. Nach 6 und 12 Wochen zeigt sich eine partielle Füllung des Leerdefekts mit Regenerationsgewebe, welches sich gut zwischen die umliegenden Ossa carpi integriert (Abb. 10 A).

Bei allen Schnitten der Kontrollgruppe ist eine schwache, gleichmäßige Färbung mit Toluidin-Blau erkennen. Eine sulfatierte, proteoglykanreiche extrazelluläre Matrix wird durch die Färbung nicht detektiert. Der Leerdefekt des Os lunatum ist vollständig mit lockerem, unorganisiertem faserigem Bindegewebe gefüllt. Zahlreiche fibroblastäre Zellen bilden wirbelförmig angeordnet das Regenerationsgewebe der Kontrollgruppen. Bei höherer Vergrößerung zeigt sich, dass keine chondrogene oder sogar osteogene Morphologie der Zellen zu erkennen ist. Es können keine geordneten Zellformationen ausfindig gemacht werden. Zwischen lockerem, faserig angeordnetem Gewebe liegen lediglich fibroblastäre und fibrozytäre Zellen in großen Abständen zueinander (Abb. 10 D).

Die Darstellung des Gefäßsystems zeigt keine Gefäßanschnitte im Regenerationsgewebe (Abb. 10 A, B, C und D), während sich in den umliegenden Handwurzelknochen zahlreiche Blutgefäße präsentieren.



**Abb. 10 (A-D):** Histologische Schnitte der Hasenhandgelenke der Kontrollgruppen (Toluidin-Blau). Abb. A zeigt den nahezu vollständig mit lockerem Bindegewebe ausgefüllten Defekt. Chondrogenes Gewebe mit proteoglykanreicher Matrix ist nicht zu erkennen. Wirbelförmig angeordnete fibroblastenartige Zellen füllen den Defekt (Abb. C und D). Es zeigen sich keine Gefäßanschnitte im Regenerationsgewebe (Abb. A, B, C, und D). Vergrößerungen: A x4; B und C x10; D x20.



### 3.3.3 Histologische Ergebnisse nach 2 Wochen

Nach Ende der *in vivo* Testreihen können keine Anzeichen für eine Infektion oder eine chronische Inflammation gesehen werden.

Abbildungen 11 A-D zeigen die histologischen Ergebnisse der linken Handgelenke der Hasen, deren Os Lunatum Defekte mit zellbeladenen Matrices besetzt wurden, zwei Wochen nach Transplantation.

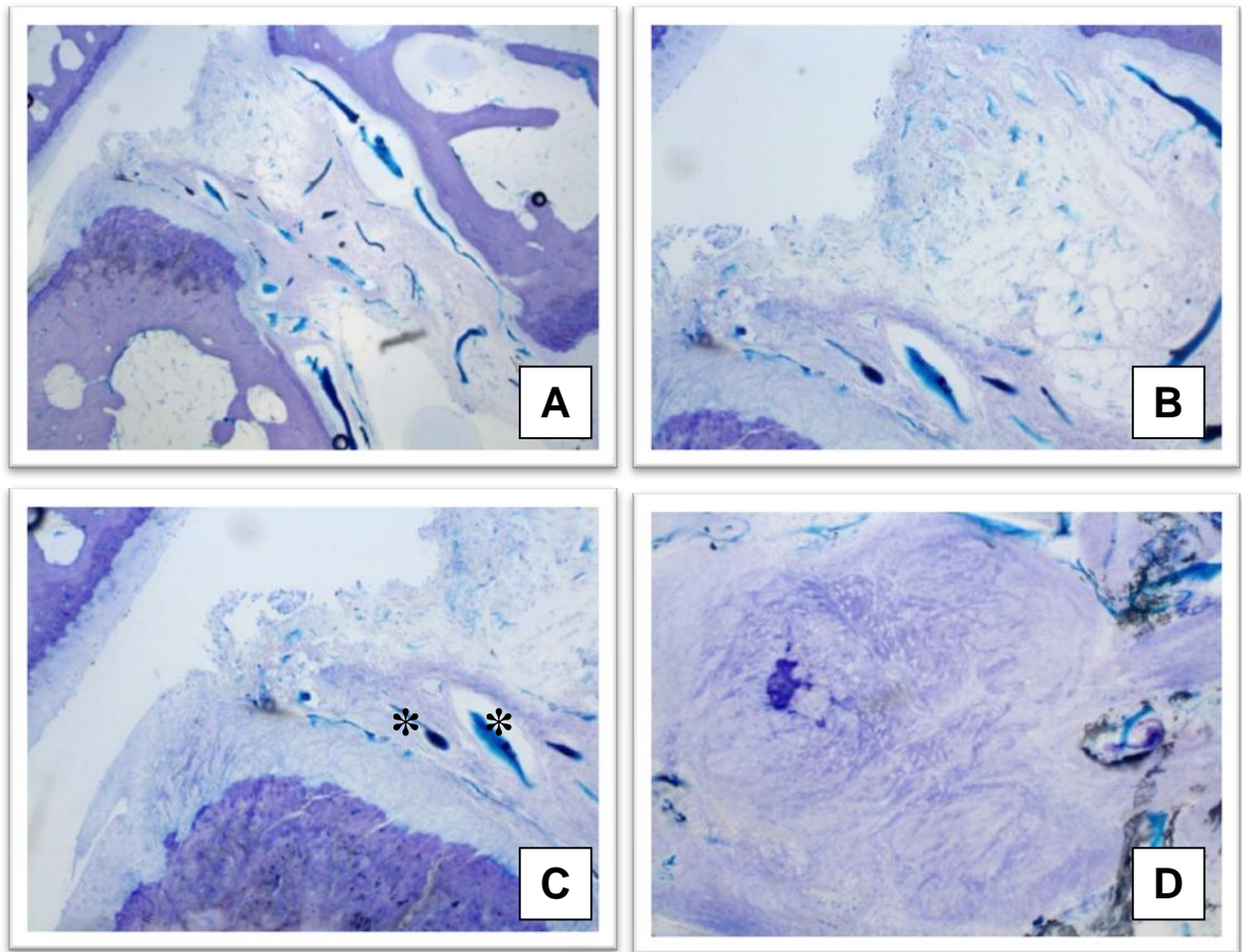
Die Matrix selbst erscheint nach 2 Wochen zum größten Teil degradiert und aufgelöst, Reste können mikroskopisch lediglich vereinzelt zwischen dem Füllgewebe gezeigt werden.

In der Toluidin-Blau Färbung kann eine partielle Füllung des Leerdefekts mit Regenerationsgewebe erkannt werden, welches sich gut zwischen die umliegenden Handwurzelknochen integriert (Abb. 11 A). Generell lässt sich nach zwei Wochen Versuchslaufzeit nur eine relativ blass färbbare, sulfatierte und proteoglykanreiche extrazelluläre Matrix erkennen.

Die Darstellung des Gefäßsystems nach Perfusion mit Berliner-Blau-Lösung kann in allen Schnitten in den umliegenden Handwurzelknochen gezeigt werden, wo sich zahlreiche Gefäßanschnitte darstellen. Zwei Wochen postoperativ können im Regenerationsgewebe selbst hingegen keine Gefäßanschnitte erkannt werden (Abb. 11 B). Einzelne durch Berliner-Blau angefärbte Regionen lassen sich auf eine Färbung der zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig degradierten Matrix zurückführen. Lediglich am Rand der Defektzone können Gefäße, welche jedoch nicht in das Regenerationsgewebe hineinreichen, gesehen werden (Abb. 11 C).

Besonders an diesen Randzonen der Matrix zeigt sich eine stärkere Anfärbung der extrazellulären Matrix. Die Zellen scheinen in diesem Bereich in kompakteren und besser geordneten Formationen zu liegen. In einer höheren Vergrößerung zeigen sich im Randbereich des Regenerationsgewebes Chondrozyten-ähnliche Zellen, umgeben von ihrer proteoglykanreichen extrazellulären Matrix. Abbildung 11 D lässt erkennen, dass im Zentrum des Regenerationsgewebes eine andere Gewebestruktur zu finden ist, welche wenig an knorpelige Strukturen erinnern lässt. Hier präsentiert sich lediglich unorganisiertes Narbengewebe, mit sich in Wirbeln anordnenden, fibroblastenartigen Zellen.

Morphologisch detektierbares ossäres Gewebe kann bei keinem der acht Versuchstiere in der histologischen Aufarbeitung gezeigt werden.



**Abb. 11, A-D:** Histologische Schnitte der Hasenhandgelenke nach Exzision des Os lunatum und Implantation einer zellbeladenen Matrix nach 2 Wochen Versuchslaufzeit (Toluidin-Blau). Abb. A zeigt eine partielle Füllung des Defektes mit Regenerationsgewebe. In Abb. B ist zu erkennen, dass keine Gefäße den Lunatum Defekt durchziehen. An der Peripherie sind jedoch einzelne Gefäßanschnitte zu erkennen (siehe \*) (Abb. C). Die Toluidin-Blau Färbung zeigt hier eine stärkere Reaktion, die Zellen erscheinen chondrozyten-ähnlich und in geordneten Formationen liegend. Abb. D zeigt fibrinöses Gewebe in Zonen ohne Vaskularisierung. Vergrößerungen: A x4; B x10; C und D x20.

### 3.3.4 Histologische Ergebnisse nach 6 Wochen

Abbildungen 12 A-H zeigen die histologischen Ergebnisse der implantierten zellbeladenen Matrices nach 6 Wochen Versuchslaufzeit.

Die Matrix selbst ist fast nicht mehr nachzuweisen und erscheint lichtmikroskopisch nahezu vollständig degradiert.

In der Toluidin-Blau Färbung kann eine gute Füllung des Leerdefekts mit Regenerationsgewebe erkannt werden, welche im Vergleich zum Ergebnis nach 2 Wochen den Raum zwischen den umliegenden Ossa carpi deutlich mehr einnimmt. (Abb. 12 A und E). Insgesamt erscheint das neu entstandene Gewebe kompakter zu sein und sich besser in den ehemaligen Lunatum Defekt zu integrieren.

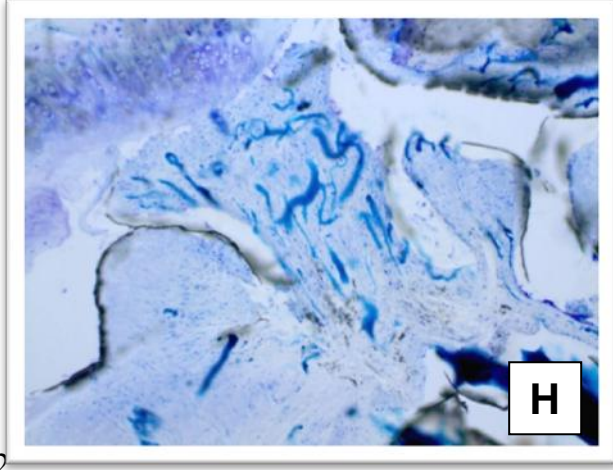
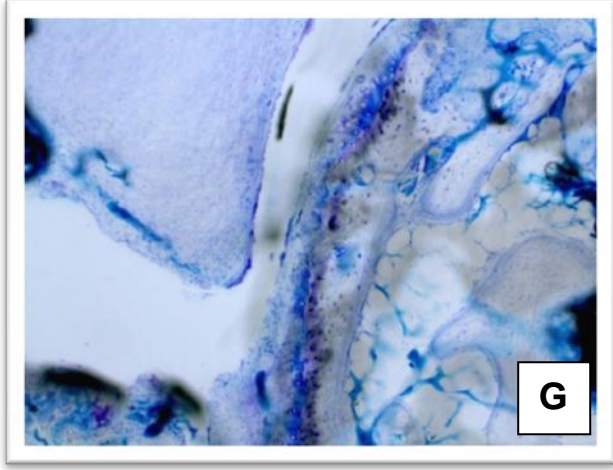
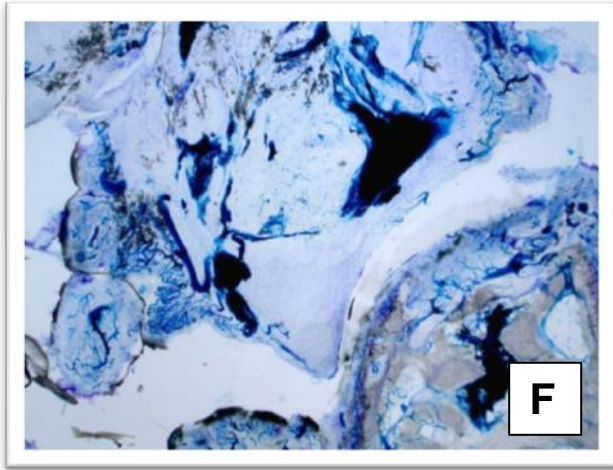
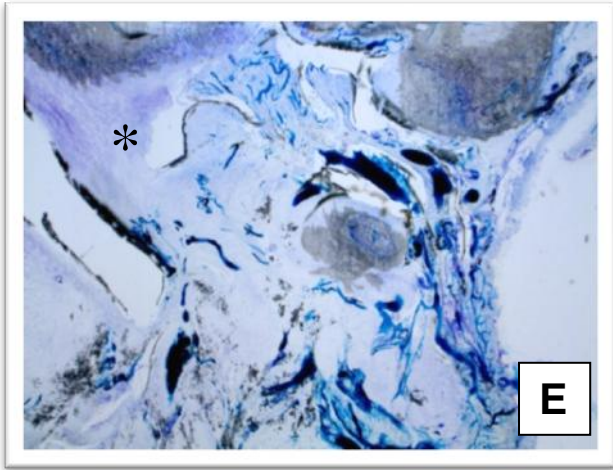
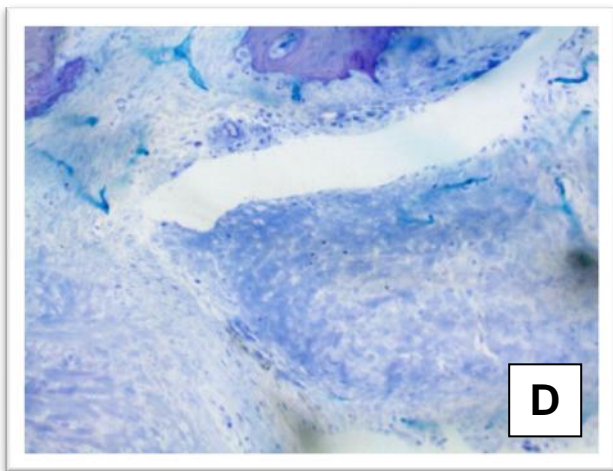
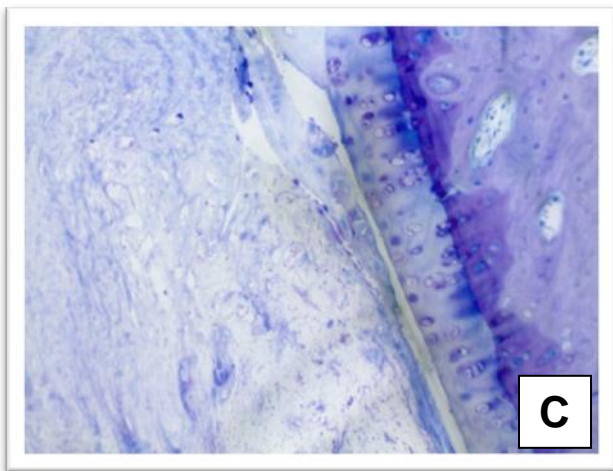
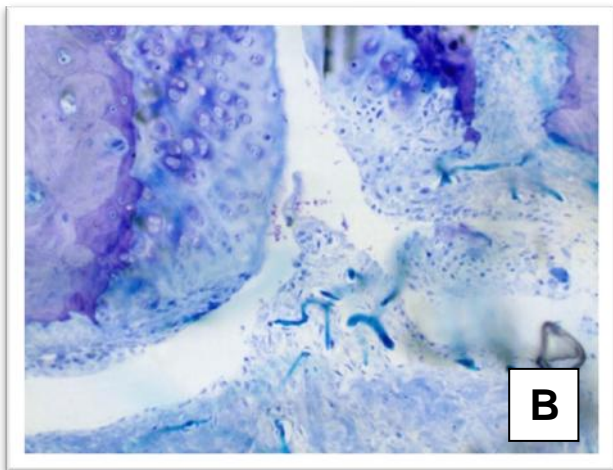
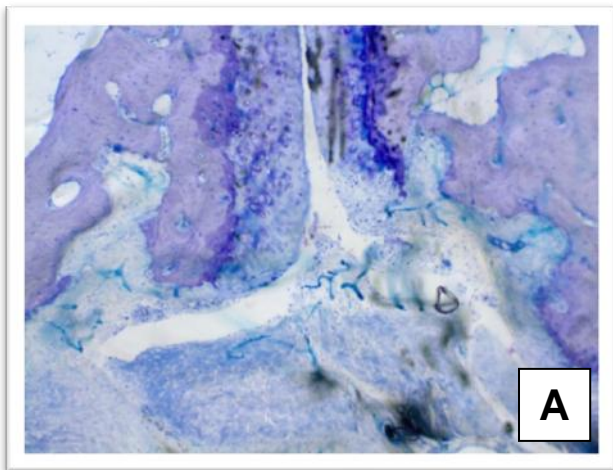
Die Färbung mit Toluidin-Blau zeigt nach 6 Wochen größere Bereiche mit Metachromasie als Hinweis auf chondrogene, proteoglykanreiche extrazelluläre Matrix. Vor allem die Peripherie des neu entstandenen Gewebes lässt eine verstärkte Reaktion der extrazellulären Matrix mit Toluidin-Blau erkennen. Hier lassen sich Chondrozyten-ähnliche Zellen, die in geordneten Zellformationen angeordnet sind, finden. Diese peripher gelegenen Zellen lagern sich in mehreren Zellschichten übereinander und scheinen besonders an Stellen mit guter Vaskularisation breitere Schichten zu bilden (Abb. 12 B, G und H). Der Aufbau dieser Schichten ist derer der umliegenden, artikulären Grenzflächen ähnlich (Abb. 12 C und D). Auch das Aussehen der peripher gelegenen Zellen des Regenerationsgewebes weist durch die Zusammenlagerung in isogenen Gruppen, dem aufgrund seiner basophilen Eigenschaft gut anfärbbaren Knorpelhof und der positiv metachromatischen extrazellulären Matrix deutliche Ähnlichkeiten mit den Chondrozyten an den Grenzflächen auf (Abb. 12 C, D und G).

Im Vergleich zu den Ergebnissen nach 2 Wochen zeigen sich nun zahlreiche Gefäßanschnitte, welche das Regenerationsgewebe durchziehen (Abb. 12 A).

Fibröses Gewebe lässt sich nur an wenigen Stellen des Defektes erkennen. Ossäre Strukturen können lichtmikroskopisch nicht detektiert werden.

Abb. 12 E zeigt die Neubildung bzw. die Integration des Regenerationsgewebes mit den umliegenden kapsoligamentären Strukturen.





**Abb. 12 (A-H):** Histologische Schnitte der Hasenhandgelenke nach Exzision des Os lunatum und Implantation einer mit mesenchymalen Stammzellen beladenen Matrix nach 6 Wochen Versuchslaufzeit (Toluidin-Blau). Abb. A und E zeigen die annähernd vollständige Füllung des Defektes mit kompaktem Regenerationsgewebe. In Abb. B, G und H ist zu erkennen, dass strukturiertes Gewebe mit erkennbarer Zellschichtung und starker Metachromasie vor allem an der Peripherie des Regenerationsgewebes zu sehen ist. Zellen hier ähneln Chondrozyten der artikulären Grenzschicht. In diesen Bereichen ist eine Vielzahl an Gefäßanschnitten zu erkennen. Bei höherer Vergrößerung (Abb. C, D und G) kann die typische Morphologie von Chondrozyten in den Zellen des Regenerationsgewebes erkannt werden. Abb. E zeigt eine capsoligamentäre Struktur, welche am neu entstandenen Gewebe inseriert (siehe \*). Vergrößerungen: A, E und F x4; B x10; C, D, G und H x 20.

### 3.3.5 Histologische Ergebnisse nach 12 Wochen

Abbildungen 13 A-F zeigen die histologischen Ergebnisse der implantierten zellbeladenen Matrix, welche in den Leerdefekt eingesetzt wurde, 12 Wochen nach Implantation.

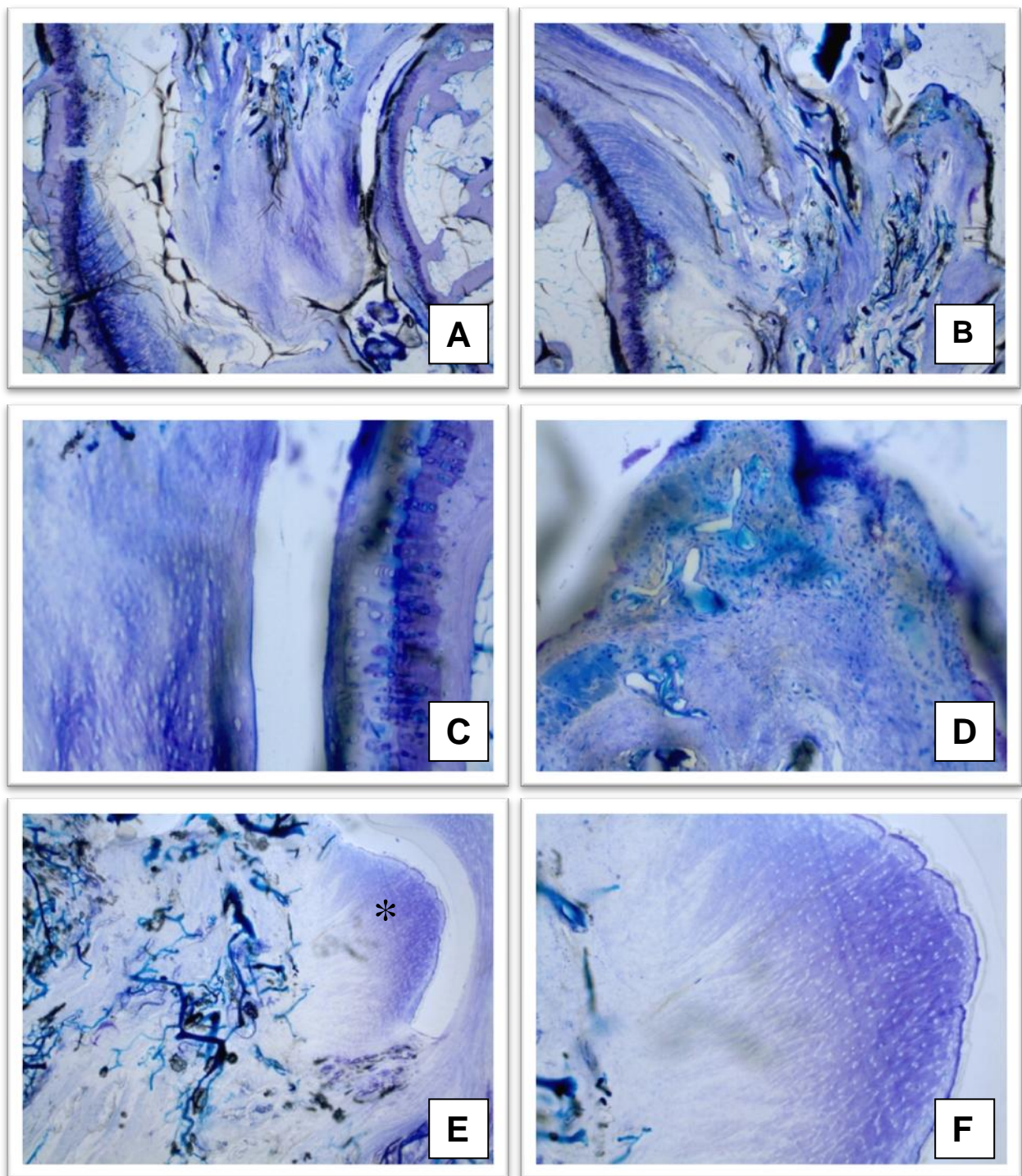
Die Matrix selbst ist nicht nachzuweisen und erscheint lichtmikroskopisch vollständig degradiert.

In der Toluidin-Blau Färbung kann weiterhin eine totale Füllung des Leerdefekts mit Regenerationsgewebe erkannt werden (Abb.13 A und B). Insgesamt erscheint das neu entstandene Gewebe kompakt und sich vollständig in den ehemaligen Lunatum Defekt zu integrieren.

Die Reaktion mit Toluidin-Blau zeigt nach 12 Wochen große Bereiche mit starker Metachromasie als Hinweis auf chondrogene, proteoglykanreiche extrazelluläre Matrix. Abb. 13 A und B zeigen, dass nicht nur die Peripherie des neu entstandenen Gewebes eine verstärkte Reaktion der extrazellulären Matrix mit Toluidin-Blau zeigt, sondern dass auch das Zentrum des ehemaligen Defektes eine starke Färbung aufweist. Chondrozyten-ähnliche Zellverbände, die in formierten Zellformationen angeordnet sind, finden sich jedoch erneut vermehrt an der Peripherie des Regenerats. Die Zellanordnung stellt sich in breiteren Schichten dar, als dies nach 6 Wochen Laufzeit der Fall war. Besonders an Stellen mit vielen Gefäßanschnitten zeigen sich vermehrt proliferierte Zellen. (Abb. 13 D und E). Die Morphologie dieser Zellen ähnelt dem Aufbau des knorpeligen Überzugs der artikulären Grenzflächen nun immer mehr, was sich auch durch die Größenzunahme der chondrozyten-ähnlichen Zellen zeigt (Abb. 13 C, D und F). Durch die Anordnung der Zellen in isogenen Gruppen, die positiv färbare metachromatische extrazelluläre Matrix, sowie durch die Morphologie der Zellen an sich, lässt sich eine deutliche Ähnlichkeit mit den Chondrozyten der Grenzflächen erkennen (Abb. 13 C, D und F).

Die Zahl der einsproßenden Gefäße zeigt sich im Vergleich zu den Ergebnissen nach 6 Wochen progredient, was ihre Dichte und die Größe der Lumina betrifft. Vor allem im Zentrum des Regenerationsgewebes lassen sich zahlreiche Gefäßanschnitte erkennen, wohingegen an der Peripherie wenige bis keine aufzufinden sind. In diesen gefäßarmen Randzonen sind vermehrt chondrozytäre Verbände erkennbar (Abb. 13 E und F), was der Morphologie artikulärer Grenzflächen entspricht. Vereinzelt lassen sich Hinweis auf ossäre Gewebsstrukturen erkennen. So zeigt die Anordnung der Zellen Ähnlichkeit zu spongiösem Gewebe (Abb. 13 A und B), was vor allen in Zonen mit hoher Vaskularisation zu sehen ist. Fibröses Gewebe kann nach 12 Wochen nur noch an wenigen Stellen des Defektes gesehen werden. Abb. 13 B zeigt die gute Integration des Konstruktes mit Verbindung zu kapsoligamentären Strukturen.





**Abb. 13 (A-F):** Histologische Schnitte der Hasenhandgelenke nach Exzision des Os lunatum und Implantation einer zellbeladenen Kompositmatrix nach 12 Wochen Versuchslaufzeit (Toluidin-Blau). Abb. A und B zeigen die komplette Füllung des Defektes mit kompaktem, gleichmäßig gefärbtem Regenerationsgewebe. Abb. C, D und F zeigen Chondrozyten-ähnliche Zellen mit starker Metachromasie und schichtartigem Aufbau. Dieser Aufbau erinnert an den normalen Aufbau von Gelenkknorpel (Abb. C) und findet sich besonders in der Peripherie(siehe \*) (Abb. E). Vaskularisation zeigt sich vor allem im Zentrum des Defektes und penetriert die umgebende knorpel-ähnliche Zellschicht nicht (Abb. E und F). Die Anordnung der zentral gelegenen Zellen erinnert an den Aufbau spongiösen Gewebes (Abb. B). Vergrößerungen: A, B und E x4; F x10; C und D x 20.

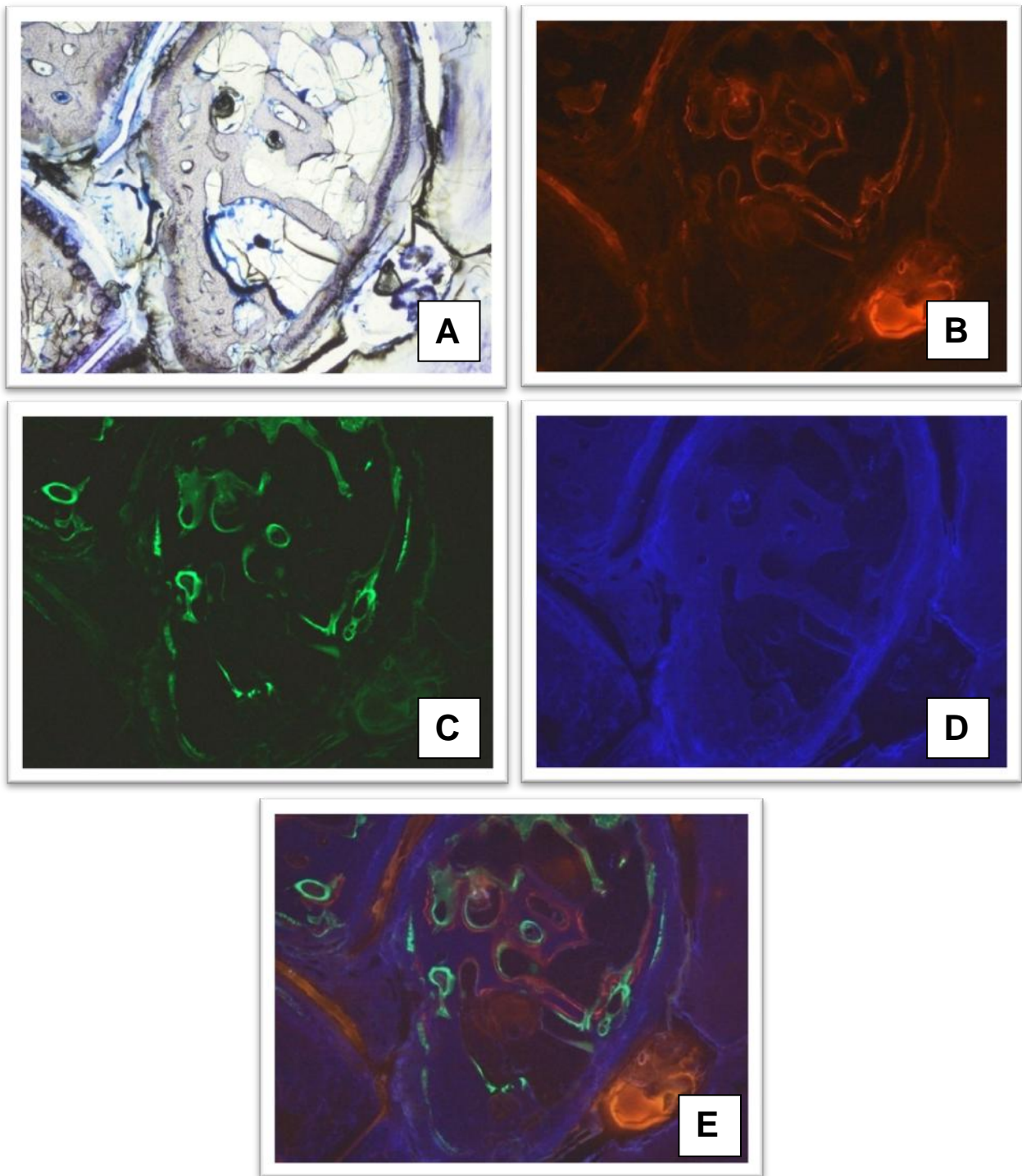
### 3.3.6 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

Allen operierten Tieren mit 6 und 12 Wochen Versuchslaufzeit waren Fluorochromfarbstoffe zu verschiedenen Zeitpunkten injiziert worden, um die unterschiedlichen Stadien der Knochenneubildung zu detektieren. Durch das subkutane Farbstoffdepot wurde ab dem Zeitpunkt der Injektion der Vitalfarbstoff über einen Zeitraum von ca. einer Woche in neu gebildete Knochenstrukturen eingebaut. Daher konnte man den verschiedenen Farbbanden und Farbflächen einen Zeitraum von jeweils einer Woche und bei wiederholter Injektion des gleichen Farbstoffes einen Zeitraum von zwei Wochen zuordnen.

Abbildungen 14 A-E zeigen Positivkontrolle der Methode, anhand eines unbehandelten Handwurzelknochens. Die jeweils erwarteten, fluoreszierenden Farben der injizierten Vitalfarbstoffe können in allen Aufnahmen mit den drei benötigten Anregungen und Filtern gezeigt werden. So erscheinen im Rotfilter spezifische Anteile des Handwurzelknochens in Folge der Alizerin Red Gabe rötlich (Abb. 14 B). Eine positive grüne Fluoreszenz zeigt sich in Abb. 14 C durch das injizierte Calcein Green. Orange Banden nach Injektion von Xylenol Orange werden aufgrund des kurzen Zeitfensters nicht dargestellt. Unspezifisch fluoreszierende Areale des Knochens zeigen sich im Blau-Filter (Abb. 14 D), was zur Anregung der Fluoreszenz an sich dient.

Legt man die fluoreszenzmikroskopischen Bilder übereinander, sind rote und grüne Banden scharf voneinander abgrenzbar. Diese Banden markieren die unterschiedliche Stärke und Ausprägung des Knochenwachstums (Abb. 14 E). Die durch Calcein Green markierten Banden spiegeln folglich den ossären Stoffwechsel ab dem 22. (6 Wochen Laufzeit) und 40. (12 Wochen Versuchslaufzeit) postoperativen Tag wider. Die roten Banden entsprechen dem Knochenwachstum ab dem 27. beziehungsweise 50. postoperativen Tag der Versuchstiere mit 6 und 12 Wochen Laufzeit. Vor allem die Spongiosa zeigt im Gegensatz zur Substantia compacta eine vermehrte, appositionelle Neusynthese des Knochens an. Besonders an den Knochenbälkchen lassen sich die im Fluoreszenzmikroskop erkennbaren Banden finden, die auch in ihrer Breite, denen an der Compacta aufzufindenden, überlegen zu sein scheinen. Die höchste Rate an umgebautem Knochengewebe kann zwischen dem 22. und 40. postoperativen Tag gesehen werden. Grüne Banden, hervorgerufen durch die Einlagerung von Calcein Green, übertrafen rote, durch Alizerin Red verursachte, Banden in ihrer Breite (Abb. 14 E). Diese Ergebnisse dienen somit als Positivkontrolle für die verwendeten Farbstoffe und die Methode.





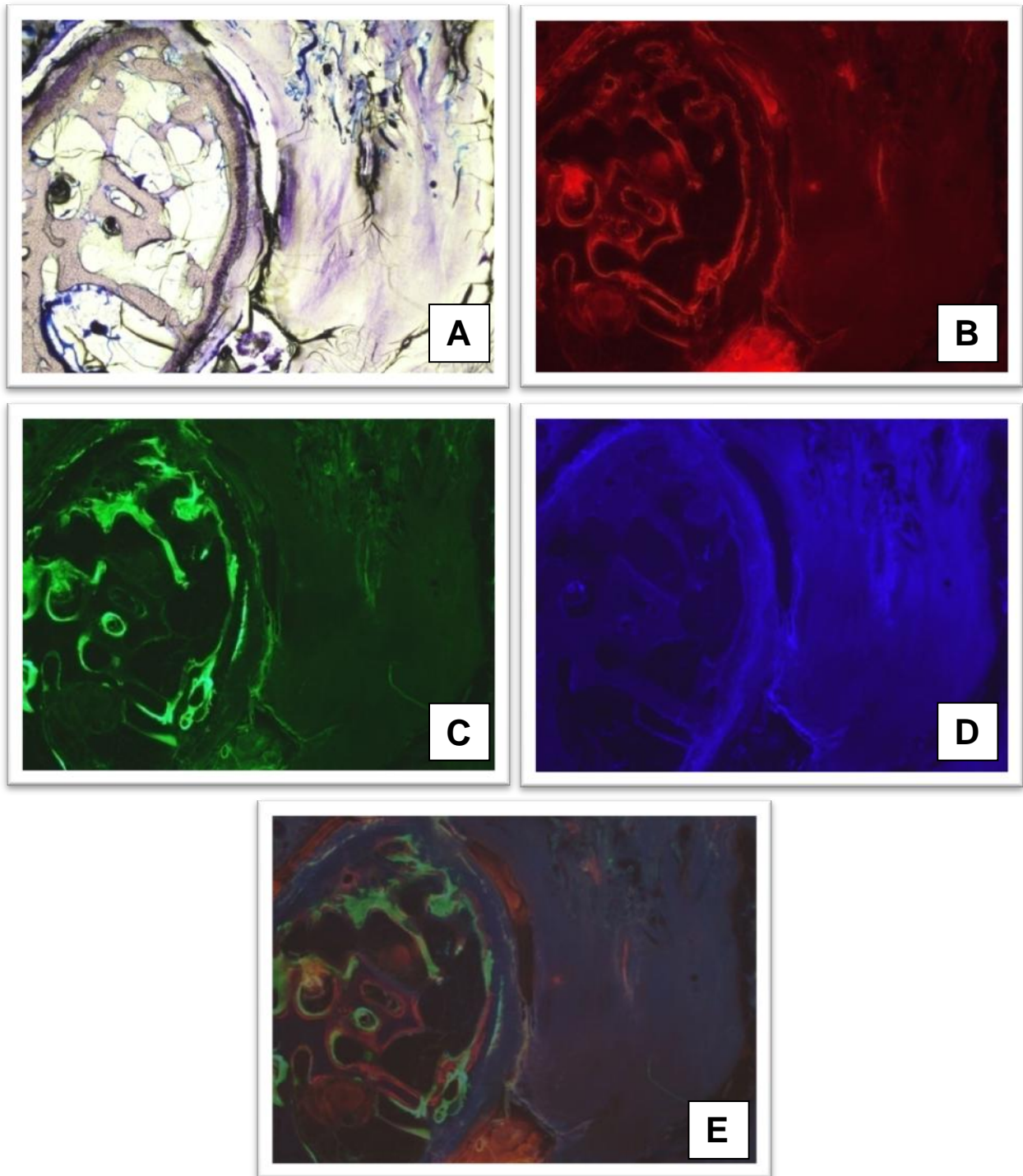
**Abb. 14 (A-E):** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Handwurzelknochens des Hasenhandgelenks. Abb. A zeigt eine lichtmikroskopische Aufsicht. Die Fluoreszenzmessung erfolgte zuerst im jeweiligen Wellenbereich (rot, grün und blau; Abb. B, C und D). Abb. E zeigt die übereinandergelegten Bilder, welche auf ein vermehrtes, schichtweise zuordnendes Wachstum vor allem in der Substantia spongiosa hindeuten. Auch in der Substantia compacta lassen sich jedoch Wachstumszonen erkennen. Die größte Rate an appositionellem Knochenwachstum lässt sich dem Zeitraum der Calcein Green Injektionen zuordnen. Vergrößerungen: A, B, C, D und E x4.

### *Ergebnisse der Fluorochromsequenzmarkierung nach Implantation einer zellbeladenen Matrix*

6 Wochen nach Implantation der zellbeladenen Matrix lassen sich bei keinem der Versuchstiere fluoreszierende Bereiche des Regenerationsgewebes als Zeichen für stattgefundenen Knochenstoffwechsel erkennen.

Bei Tieren mit 12 Wochen Laufzeit zeigen sich hingegen positiv fluoreszierende Zonen im Regenerationsgewebe (Abb. 15 B-E). Diese lassen sich – im Vergleich zur lichtmikroskopischen Aufnahme – mit Bereichen, die eine vermehrte Metachromasie in der Toluidin-Blau-Färbung, sowie ein vermehrtes Auftreten von Neovaskularisation zeigen, decken. (Abb. 15 A). An Stellen mit vielen Gefäßanschnitten und chondrozyten ähnlichen Zellschichten sind so sowohl rot, als auch grün fluoreszierende Signale detektierbar. Die höchste Stoffwechselrate ergibt sich zwischen dem 22. und 40. postoperativen Tag, da sich grüne Zonen im Vergleich zu roten quantitativ vermehrt darstellen.

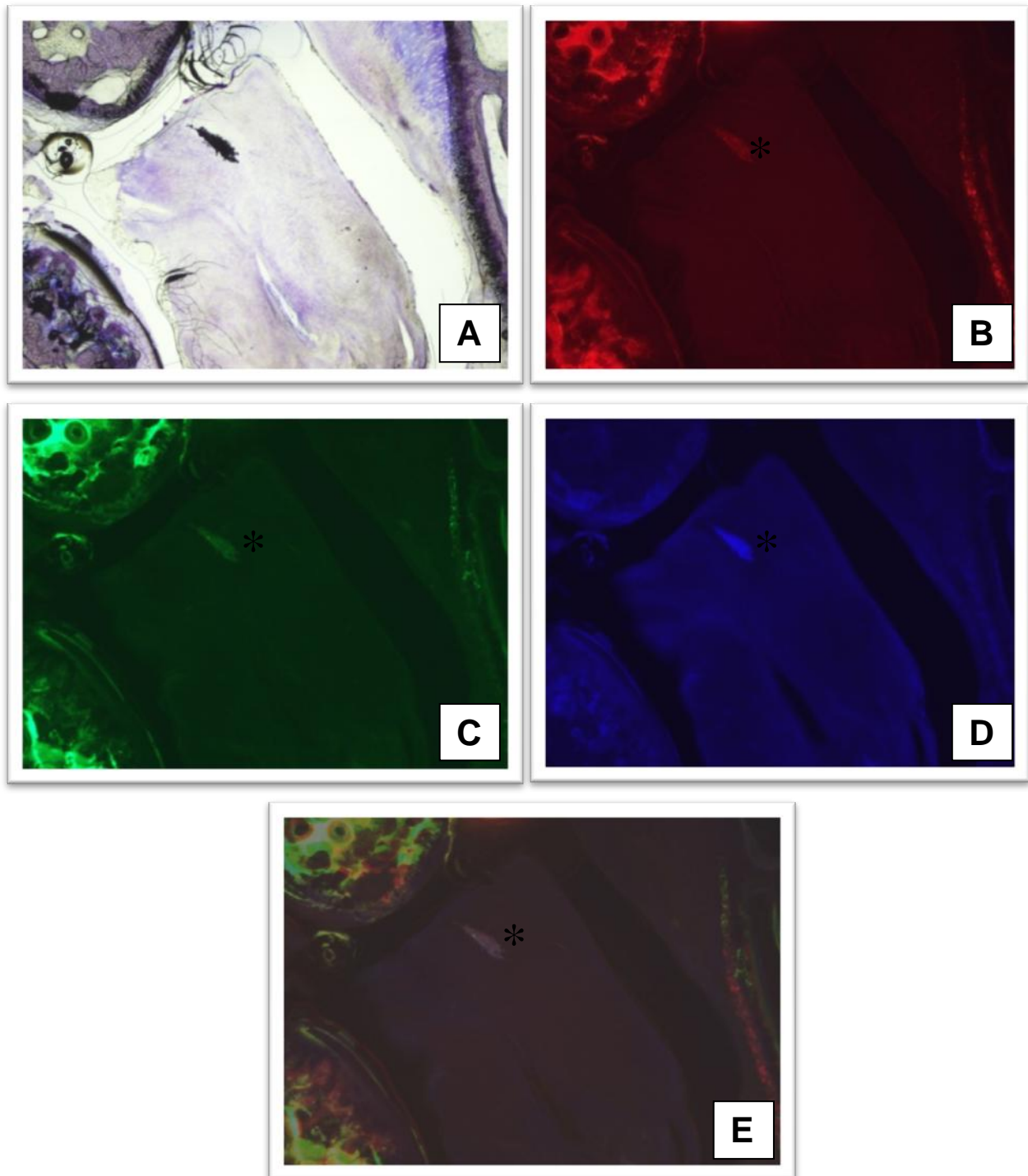
Calcifizierte Blutgefäße beziehungsweise Hämatome zeigen sich rot fluoreszierend (Abb. 15 B). Im Vergleich zum fluoreszenzmikroskopischen Ergebnis der Kontrolle scheint das erhaltene Signal jedoch weniger deutlich. Außerhalb der Os Lunatum Defekte können zahlreiche Stellen mit positiver Fluorochromsequenzmarkierung als Zeichen neugebildeter Knochenmatrix gesehen werden. Vor allem in der Substantia spongiosa zeigen sich deutlich voneinander abgrenzbare, da unterschiedlich gefärbte Banden, als Zeichen einer zeitlich versetzt ablaufenden Knochenneubildung.



**Abb. 15 (A-E):** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Hasenhandgelenks nach 12 Wochen. Neben dem Os capitatum befindet sich der mit einem Zell-Matrix-Konstrukt gefüllte Leerdefekt. Abb. A zeigt eine lichtmikroskopische Aufsicht. Deutliche Signale zeigen sich an Stellen mit vermehrter Metachromasie und Gefäßanschnitten (Abb. C). Grüne Bereiche treten vermehrt auf und zeigen den Zeitraum der höchsten Stoffwechselrate an. Calcifizierte Gefäße oder Hämatome fluoreszierten im Rotfilter (Abb. B). Vergrößerungen: A, B, C, D und E x4.

### *Ergebnisse der Fluoreszenzmarkierung der Kontrollgruppe*

Abbildungen 16 A-E zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der Kontrollgruppe, in deren Os lunatum Defekt die Implantation einer Leermatrix ohne Zellbeladung erfolgt war. Bei allen Tieren dieser Gruppe können im Defektgewebe keine positiven fluoreszierenden Signale gesehen werden, die auf einen stattgefundenen Knochenstoffwechsel hinweisen (Abb.16 B-E). Lediglich ein calcifizierter Gefäßanschnitt zeigt eine positive Fluoreszenz im Rot- und Grünfilter (Abb.16 B und C). Die umliegenden Ossa carpi weisen erneut deutlich abgrenzbare rote und grüne Banden auf, was vor allem den Bereich der Spongiosa betrifft.



**Abb. 16 (A-E):** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Hasenhandgelenks der Kontrollgruppe. Zwischen dem Radius, dem Os capitatum, sowie dem Os triquetrum befindet sich der Leerdefekt. Abb. A zeigt eine lichtmikroskopische Aufsicht. Die Fluoreszenz-messung erfolgte im jeweiligen Wellenbereich, wobei kein Nachweis von neugebildeter Knochenformation gesehen werden konnte (rot, grün und blau; Abb. B, C und D). Lediglich ein calcifiziertes Gefäß zeigt ein positives Ergebnis (siehe \*) (Abb. B, C und D). Vergrößerungen: A, B, C, D und E x4.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodische Überlegungen

Eine allseits akzeptierte Methode zur Therapie der aseptischen Osteonekrose bei Morbus Kienböck ist bis heute nicht gefunden. Seit vielen Jahren wird auf verschiedene Art und Weise versucht, die Progredienz der Krankheit aufzuhalten, um einen möglichen Funktionsverlust des Handgelenks zu verhindern. Die derzeitigen Möglichkeiten reichen von konservativen Maßnahmen (*Botelho, 1999; Delaere et al., 1998*), niveauangleichenden Operationen (*Almquist et al., 1982; Weiss et al. 1991; Zenzai et al., 2005*), Arthrodesen (*Garcia-Elias et al., 1998*), Revaskularisationsoperationen (*Daecke et al., 2005*), bis zum Ersatz des Os Lunatum mit Fremd- oder Eigenmaterial (*Shigematsu et al., 2006*). Mögliche immunologische Begleitreaktionen bei der Verwendung von Fremdmaterial richteten den Blick auf den Einsatz autologen Gewebes.

So stellen zellbasierte Tissue Engineering Strategien eine neue Option dar, um z.B. osteochondrale oder ossäre Defekte zu behandeln. Bis dato zielten die meisten dieser Strategien darauf hin, Teile von Knochen oder Knorpel zu rekonstruieren. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, einen kompletten Knochen mitsamt seinen artikulären Grenzflächen, Knorpelüberzug und Gefäßversorgung durch den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen zu regenerieren.

Zahlreiche Autoren konnten erfolgreich eine Heilung von Knochendefekten durch präformierte, knorpelige Konstrukte nachweisen (*Case et al., 2003; Kim et al., 1994; Vacanti et al., 1995*). Vacanti et al. füllten in einem Rattenmodell knöcherne Defekte der Schädelkalotte mit periostealen Progenitorzellen (*Vacanti et al., 1995*). Es zeigte sich, dass das Regenerationsgewebe in frühen Zeitpunkten aus Knorpel bestand. Dieses Gewebe entwickelte sich im Anschluss durch die Kaskade der enchondralen Ossifikation zu Knochen. Ähnlich zeigten Huang et al. in einem Hasenmodell, dass es möglich ist, durch den Einsatz von Konstrukten aus mesenchymalen Stammzellen einen osteochondralen Defekt zu füllen (*Huang et al., 2006*).

Basierend auf den Versuchen von Huang et al. entschieden wir, die Matrices in einem chondrogenem, statt in einem osteogenen Medium vor zu kultivieren, um Vorteile aus dem physiologischen Prozess der enchondralen Ossifikation zu gewinnen. Wir sahen in einer rein chondrogenen Vordifferenzierung den Vorteil, dass eine mögliche vaskuläre Invasion Teile



der Kaskade der enchondralen Ossifikation induziert. Dies könnte in ein vaskularisiertes Regenerationsgewebe resultieren. Angiogenese scheint eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Reparatur und Regeneration von osteochondralen Defekten zu sein (Swieszkowski *et al.*, 2007).

Nicht allein die Wahl eines geeigneten Kulturmediums, sondern auch die Frage nach geeigneten Trägermaterialien ist für die Differenzierung der Zellen wichtig. Nach Freed sollte eine Matrix zur Reparatur von osteochondralen Defekten mehrere Voraussetzungen wie eine gut reproduzierbare Größe, eine Porösität über 90 %, eine Oberfläche mit guter Zelladhäsion, eine Materialdegradation, die im gleichen Umfang wie die normale Gewebedegradation erfolgt, sowie Bestandteile, die keine Entzündung induzieren, aufweisen (Freed *et al.*, 1994). Zahlreiche andere Autoren bestätigten diese Anforderungen an ein zufriedenstellendes Trägermaterial (Rudert und Wirth, 1998; Solchaga *et al.*, 2000; Hunziker, 2002; Park *et al.*, 2005; Redmann *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2006). Wir verwendeten Kompositmatrices, zusammengesetzt aus Hyaluronsäure und Gelatine. Hyaluronan wird von spezifischen Zellrezeptoren erkannt und reguliert so die Zelladhäsion, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und Zelltaxi. Desweiteren beeinflusst es die Angiogenese und den Heilungsprozess (Partsch *et al.*, 1989). In unserem Versuch wurde benzylverestertes Hyaluronan verwendet, das bereits gute Biokompatibilität und Biodegradation gezeigt hatte (Campoccia *et al.*, 1998). Das Material wurde zudem bereits mehrfach zur Behandlung von Defekten verschiedener Gewebearten verwendet (Alini *et al.*, 2003; Cristino *et al.*, 2005; Pavesio *et al.*, 2003). Ein Nachteil reiner Hyaluronsäurematrices ist die verminderte Zelladhärenz (Kito *et al.*, 1996). Die zweite Komponente der verwendeten Matrix bestand aus Kollagen in Form von Gelatine. Dieses Material wurde aufgrund seiner Biokompatibilität bereits in vielfacher Form als Matrix eingesetzt, da es Zelladhäsion und Proliferation positiv beeinflusst. Nachteilig stellt sich die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Größe dar, da reine Kollagenmatrices nach Kontakt mit zellhaltigem oder zellfreiem Medium ihr Volumen stark ändern (Torres *et al.*, 2000). Durch den Einsatz von Kompositmatrices mit beiden oben aufgeführten Bestandteilen sollte der Stabilitätsnachteil der reinen Kollagenmatrices und der Nachteil bezüglich Zelladhärenz der Hyaluronsäurematrices ausgeglichen werden. Laut Angele *et al.* sollte mit einer Degradationsrate von 2-3 Monaten gerechnet werden können, was genug Zeit für eine chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Progenitorzellen gewährleisten würde (Angele *et al.*, 1999 und 2003).

Neben eines geeigneten Kultivierungsmediums und der Zusammensetzung der Matrix ist die Wahl der Versuchstiere zur Durchführung des Tiermodells von großer Bedeutung. Bereits seit

Jahren beschäftigen sich diverse Forschergruppen mit der Therapie von osteochondralen Defekten, wobei die Mehrzahl dieser Untersuchungen an Tiermodellen stattfand. Mögliche Tiermodelle mit entsprechenden Untersuchungen sind Ratten (*Noguchi et al., 1994*), Kaninchen (*Salter et al., 1975*), Schweine (*Wang et al., 2000*), Schafe, Ziegen (*Bruns et al., 1992*), Hunde (*Breinan et al., 1997*) und Pferde (*Hedrickson et al., 1994*). Bei all diesen Versuchsreihen wurde mit autologen Stammzellen gearbeitet, so dass auf die Verwendung eines Nackttiermodells zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen verzichtet werden konnte. Bei unseren Versuchen wählten wir New Zealand White Rabbits als Versuchstiere aus, da deren Anatomie des Handgelenks der von Menschen ähnelt. So entspricht der Aufbau der Handwurzelknochen mit der zweireihigen Anordnung dem humanen, so dass sich bessere Vergleiche ziehen lassen. Für die Beurteilung der osteochondralen Defektheilung ist zudem das Alter der Tiere von Bedeutung. Die Regeneration der Defekte und besonders der subchondralen Knochenlamelle ist bei juvenilen Tieren schneller und besser als bei adulten Tieren (*Frenkel et al., 1997*). Aus diesem Grund wurde das Alter der Kaninchen so gewählt, dass sie als ausgewachsen galten, um bei allen Tieren gleiche Bedingungen zu erreichen. Generell ist es jedoch naheliegend, dass Untersuchungen von Tissue Engineering Strategien an Kleintieren zahlreiche Limitierungen aufweisen. So kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein ähnliches Versuchsmodell an Großtieren, wie es zum Beispiel das „mini-pig“ darstellt, funktionieren würde. Für diese Tiermodelle würden größere Matrices benötigt, um den Defekt ausreichend füllen zu können. Die Diffusion von Wachstumsfaktoren und anderen notwendigen Substanzen in die Matrix hinein könnte aufgrund der Größe eingeschränkt sein. Auch die Diffusion von metabolischen Produkten aus der Matrix heraus wäre problematisch. So zeigte sich in unserer Versuchsreihe, dass bereits bei Matrices mit kleinem Volumen in der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung lokale Unterschiede im Proteoglykan- und Kollagen-II-Gehalt auftraten. An der Peripherie der Matrices zeigte sich sowohl eine positivere Reaktion mit Toluidin-Blau, als auch mit den Antikörpern der Immunhistochemie. Dies kann als Hinweis auf eine suffizientere Versorgung der Zellen des Randbereichs mit den notwendigen Substanzen gesehen werden.

### **4.2 *In vitro* Chondrogenesemodell**

Initial wurde das *in vitro* Verhalten der mit mesenchymalen Stammzellen beladenen Matrices und der Zellaggregate getestet. Hierzu wurden diese über einen Zeitraum von 21 Tagen in



chondrogenem Differenzierungsmedium bei regelmäßigem Wechsel kultiviert und anschließend histologisch und immunhistochemisch aufbereitet.

Knorpel ist ein zellarmes Gewebe mit einer extrazellulären Matrix, bestehend aus Wasser und anderen Matrixkomponenten, insbesondere Kollagen II und Proteoglykanen (*Sandell und Aigner, 2001*). Immunhistologische Schnitte humanen Gelenkknorpels konnten zeigen, dass Kollagen II, als das für Knorpelgewebe typische Kollagen, gleichmäßig in der Matrix verteilt ist (*Horton et al., 1983*). Die Analysen der histologischen Schnitte unserer Versuchsreihe zeigten, dass die positive Metachromasie, dargestellt durch Toluidin-Blau, Hinweise auf eine proteoglykanreiche, extrazelluläre Matrix gaben. Positive immunhistochemische Färbungen detektierten in allen Schnitten Kollagen Typ II als Bestandteil von chondrogenem Gewebe. Nach 21 Tagen Kultivierung zeigte sich so, dass mesenchymale Stammzellen in Chondrozyten-ähnliche Zellen differenziert waren und begonnen hatten extrazelluläre Matrix zu bilden. Eine genauere Typisierung des chondrogenen Gewebes hätte die Bestimmung weiterer Marker verlangt. So kann im hypertrophen Knorpel und in degenerierten Chondrozyten vermehrt Kollagen I nachgewiesen werden (*Horton et al., 1983*). Kollagen X hingegen findet sich gehäuft in hypertrophem chondrogenem Gewebe, im Bereich heilender Frakturzonen (*Mayne et al., 2003*), sowie in der Wachstumsfuge vom Knorpel zum Knochen (*Schmid et al., 1990*).

#### **4.3 Tierexperimentelle Ergebnisse**

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, einen kompletten Knochen *in vivo* durch implantierte, zellbeladene Matrices zu regenerieren.

Die Handgelenke der Versuchstiere wurden 2, 6 und 12 Wochen nach Implantation der Matrices untersucht und die Defekte histologisch aufgearbeitet. Ebenso wurden histologische Schnitte von den Hasenhandgelenken der Kontrollgruppe angefertigt, deren Lunatumdefekt mit einer zellfreien Matrix gefüllt worden war. 2 Wochen postoperativ zeigte sich bereits eine partielle Füllung mit Regenerationsgewebe, das in der Toluidin-Blau-Färbung eine leicht positive Reaktion aufwies. Bei Tieren mit einer Versuchslaufzeit von 6 Wochen, war diese Färbung verstärkt erkennbar, was auf eine Zunahme der extrazellulären Matrix hindeutet. Auch 12 Wochen nach Implantation der zellbeladenen Matrix zeigte sich, dass das Regenerationsgewebe beinahe ganz mit Toluidin-Blau angefärbt werden konnte. Vermehrt

chondrogenes Gewebe mit extrazellulärer Matrix und weniger lockeres Bindegewebe füllte den Defekt.

Bei Betrachtung der Zellen fiel auf, dass mit Zunahme der Versuchslaufzeit deren Anordnung und Formation immer geordneter erschien und sie sich in immer breiteren Zellschichten zusammenlagerten. Zudem ähnelten deren Morphologie zunehmend der von Chondrozyten. Vor allem in der Peripherie des neu entstandenen Gewebes, in unmittelbarer Nachbarschaft zu den artikulären Flächen der angrenzenden Handwurzelknochen, konnten vermehrt Chondrozyten-ähnliche Zellen in geordneten Formationen und breiten Zellschichten gezeigt werden. 12 Wochen postoperativ zeigt sich in der Peripherie des Regenerationsgewebes eine Zellanordnung, die dem typischen zonalen Aufbau von Gelenkknorpel ähnelt (siehe 1.3). So liegen in der Tangentialzone (Zone I) die Zellen spindelförmig, runden sich in Zone II, der Übergangszone, etwas ab und ordnen sich dann in der Radiärzone (Zone III) säulenartig an. Angele et al. berichteten, dass zyklisch hydrostatischer Druck zu einer verbesserten Induktion der Chondrogenese führen kann (*Angele et al., 2003*). Da die Tiere postoperativ ihr Handgelenk nach Maßgabe der Beschwerde belasten durften, wurde so Druck auf die Handwurzelknochen untereinander und somit auch auf das Zell-Matrix-Konstrukt im Defekt ausgeübt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich vor allem in Randzonen vermehrt Chondrozyten-ähnliche Zellen mit proteoglykanreicher Matrix zeigen. Die anatomisch vorgegebene zentrale Lage des Os lunatum, das von den restlichen Handwurzelknochen umgeben wird, könnte so die Induktion der Chondrogenese unterstützt haben. Auch eine im Vergleich zum Zentrum der Matrix verbesserte Diffusion von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren in die Randbereich, sowie ein günstigerer Austausch toxischer Metabolite könnten als Ursache für lokal kompaktere Zellschichten mit positiveren Reaktionen in den histologischen Aufarbeitungen gesehen werden.

Als Hinweis auf extrazelluläre Matrix mit einem hohen Gehalt an Proteoglykanen ergab sich bei allen histologischen Schnitten eine positive Metachromasie der Toluidin-Blau Färbung. Eine genauere Verifizierung des Gewebes könnte durch spezifische immunhistochemische Untersuchungen erfolgen. So besteht die extrazelluläre Matrix von Gelenkknorpel zum größten Teil aus Kollagen Typ II (siehe 1.2.1). Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Bestimmung der Zellformationen im ehemaligen Leerdefekt wäre eine gentherapeutische Vorbehandlung der eingebrachten Zellen mit fluoreszierenden Markern. Diese würde zeigen, dass es sich bei den Zellen des Regenerationsgewebes um die iatrogen eingebrachten Zellen handelt.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt unserer Arbeit beschäftigte sich mit der Darstellung des Gefäßsystems, durch die eine Neovaskularisation des Regenerationsgewebes gezeigt werden sollte. Hierzu wurde in einem selbst erarbeiteten Konzept das Gefäßsystem der Versuchstiere durch eine Berliner-Blau-Lösung dargestellt (siehe 2.2.2.4). In allen histologischen Schnitten konnten Gefäßanschnitte gezeigt werden, was das Funktionieren der Methode belegt. Generell hat ein gesetztes Trauma im Knorpel- und Knochenbereich eine Entzündung zur Folge, so dass Entzündungszellen angelockt (*Winet, 1996*) und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden (*Aspenberg et al., 1996*). Diese Wachstumsfaktoren stimulieren unter anderem die Angiogenese (*Cunningham et al., 1992*). 6 Wochen nach Implantation der zellbeladenen Matrix zeigten sich zahlreiche Gefäßanschnitte, welche das Regenerationsgewebe durchzogen. Auch nach 12 Wochen sahen wir bei unseren Tieren in den histologischen Färbungen zahlreiche Gefäßanschnitte, die im Vergleich zu den Ergebnissen nach 6 Wochen progredient in ihrer Anzahl und dem Durchmesser ihrer Lumina erschienen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 6 Wochen konnten nun vor allem im Zentrum des ehemaligen Defektes Gefäßanschnitte gezeigt werden. Periphere Zellschichten wurden nicht penetriert, was der Morphologie artikulärer Grenzflächen entspricht. Im Vergleich dazu fanden sich im Defektgewebe der Kontrollgruppen keine Anzeichen von Neovaskularisation. Das Regenerationsgewebe an sich, bestehend aus lockerem Bindegewebe, wies keine Gefäßanschnitte auf.

Bei der Implantation von *in vitro* differenziertem Knorpelgewebe aus mesenchymalen Stammzellen bedarf es zur optimalen Integration *in vivo* eine initiale Weiterversorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Dies ist zum Einen über Diffusion, zum Anderen über die Neubildung von Gefäßen möglich. Auch bei der späteren Erhaltung des Knorpelgewebes, sowie zur Induktion der Kaskade der enchondralen Ossifikation kommt der Angiogenese eine große Bedeutung zu. Die Reparaturfähigkeit osteochondraler Defekte an sich wird geprägt durch deren Gefäßanatomie. Es konnte gezeigt werden, dass Defekte in rein avaskulären Meniskuszonen oder in artikulärem Knorpel, der allein über Diffusion ernährt wird, kein endogenes Reparaturpotential aufweisen. In vaskularisierten Zonen hingegen ist eine endogene Regeneration möglich (*Setton et al., 1999*). Es wird angenommen, dass die Reparaturzellen oder mesenchymen Stammzellen aus dem umliegenden Gefäßsystem zum Defekt gelangen können, jedoch nur bei Anschluss des Defektareals an die Gefäßversorgung. Unter bestimmten Milieubedingungen müssen diese Zellen zur Regeneration des Defektes schließlich zu Fibrochondrozyten differenzieren, um für artikulären Knorpel spezifische Kollagen-II haltige Matrix produzieren zu können, was durch rein endogene Maßnahmen

nicht erreicht wird (*Klompaker et al., 1996*). Auch in unserer Versuchsreihe zeigt sich, dass an Stellen mit starker Vaskularisation vermehrt Chondrozyten-ähnliche Zellen gefunden werden können. Diese Zellen wiesen im Vergleich mehr extrazelluläre Matrix auf, was durch eine stärker positive Toluidin-Blau-Färbung sichtbar wird. An Stellen mit wenigen Gefäßanschnitten schienen die Zellen weniger ECM zu produzieren oder es lag sogar nur lockeres Bindegewebe vor. Bei den Ergebnissen nach 12 Wochen spricht die zum Teil auffindbare Anordnung der Zellen, die einen schichtigen Aufbau erkennen ließ, und das gleichzeitige Vorhandensein größerer Gefäße, zudem dafür, dass die stattgefundene Angiogenese die optimale Integration und Erhaltung des implantierten Knorpelgewebes begünstigt. Schumann zeigte, dass mesenchymale Stammzellen einen angiotaktischen Einfluss besitzen, da im Regenerationsgewebe der Kontrollgruppen keine Neovaskularisation zu erkennen war (*Schumann, 2004*). Um genauere Einblicke in die Angiogenese zu erhalten, müssten in weiteren Versuchsreihen spezifische Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF oder TGF- $\beta$ 1 mittels ELISA bestimmt werden. VEGF ist ein mechanosensitiver, an der endochondralen Ossifikation beteiligter Faktor (*Blain et al. 2001; Smith et al. 2001; Tamura et al. 2001; Mayr-Wohlfart et al. 2002; Schild and Trueb 2002*). Kaigler et al. konnten so zum Beispiel zeigen, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark VEGF in ausreichenden Konzentrationen exprimieren (*Kaigler et al., 2003*), um damit die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen in Kollagenscaffolds zu erhöhen (*Lane et al., 1986*). TGF- $\beta$ 1 steigert bei der enchondralen Ossifikation die VEGF Expression von Chondrozyten (*Kaigler et al. 2003*) und stabilisiert die im Verlauf der Angiogenese neugebildeten Gefäße. Peng et al. zeigten, dass durch VEGF umgewandelte MSC mit durch BMP-4 transfizierten Zellen zusammenarbeiteten, um Knochenheilung in Defekten von Kalotten zu heilen (*Peng et al., 2002*). BMPs stimulieren die Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten (*Urist, 1965; Wozney, 1988*). In zahlreichen Tiermodellen zeigte sich, dass so z.B. BMP-2, BMP-4 und BMP-7 die enchondrale Ossifikation im Knochenstoffwechsel und bei der Reparatur von osteochondralen Defekten induzieren (*Yasko, 1992; Rodgers, 1998; Ripamonti, 1996*).

Auch die Zufuhr von Wachstumshormon (GH) könnte einen positiven Effekt auf enchondrale Ossifikation haben. Experimente an Zellkulturen zeigen, dass die Zufuhr von GH die Expression von BMP-2- und BMP-4 quantitativ um ein vielfaches steigert. GH kann somit seine osteogene Wirkung *in vitro* zusätzlich durch die Aktivierung des lokalen Morphogens BMP entfalten (*Li et al., 1998*). Bail, Kolbeck und Raschke zeigten, dass systemische GH-Zufuhr die enchondrale Ossifikation beschleunigt. (*Bail et al., 2002; Kolbeck et al., 2003; Raschke et al., 1999*). Durch die Zugabe von Vascular endothelial growth factor oder anderen

endothelialen Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium der mesenchymalen Stammzellen, könnte eine verstärkte Angiogenese mit besseren Aussichten auf enchondrale Ossifikation gefunden werden.

Bei unserer Untersuchung handelt es sich um eine erste Studie, um zu testen, in wieweit Angiogenese des Regenerationsgewebes und enchondrale Ossifikation in Zusammenhang stehen. Die Darstellung des Gefäßsystems war rein quantitativ, so dass genauere Einblicke durch eventuelle immunhistochemische Färbungen des Endothels erbracht werden könnten. Zudem wird in einer weiteren Versuchsreihe getestet, ob durch eine fehlende Vordifferenzierung in chondrogenem Medium bessere Ergebnisse erreicht werden könnten. So sollen kultivierte Stammzellen sofort nach Aufbringen auf die Matrices in den Lunatum Defekt implantiert werden. Ohne Vordifferenzierung soll so die Differenzierung der Stammzellen nicht auf eine Zelllinie beschränkt werden.

### *In vivo Fluoreszenzmarkierung*

Die *in vivo* Fluoreszenzmarkierung wurde durchgeführt, um einen stattgefundenen Knochenstoffwechsel darstellen zu können. Zudem sollten anhand der Ossifikationsbanden, entstanden durch appositionelle Knochenneusynthese, quantitative Aussagen über die Anbaugeschwindigkeit knöcherner Elemente und den Zeitraum gemacht werden. Das Funktionieren der Methode konnte durch die als Positivkontrolle dienenden Handwurzelknochen belegt werden, an denen, durch die in verschiedenen Farben fluoreszierenden Banden, der Knochenstoffwechsel aufgezeigt werden konnte.

Bei den Versuchstieren mit 12 Wochen Laufzeit zeigten sich fluoreszierende Signale im zentralen Bereich des Regenerationsgewebes. Vor allem an Stellen mit einer hohen Dichte an Gefäßstrukturen, sowie einer starken Anfärbung mit Toluidin-Blau konnten fluoreszierende Signale dargestellt werden. Die höchste Rate an appositionellem Knochenwachstum und Knochenstoffwechsel betraf den Zeitraum ab dem 22. bzw. 40. postoperativen Tag. Grün fluoreszierende Banden nach Calcein Green Einlagerung füllten größere Bereiche aus als rot fluoreszierende. Frosch et al. zeigten in einer Versuchsreihe, dass das Maximum an neuen Knochenformationen in zellbeschichteten Implantaten nach 15 bzw. 30 Tagen zu erkennen ist, was sich mit unseren Ergebnissen deckt (Frosch et al., 2003). Auffallend war, dass sich fluoreszierende Stellen mit Bereichen, welche eine stärkere Metachromasie in der Toluidin-Blau-Färbung zeigten, decken ließen. Im Regenerationsgewebe konnten hier auch vermehrt

Gefäßanschnitte als Zeichen der Neovaskularisation gesehen werden. Im Vergleich dazu zeigten sich in den Defekten der Kontrollgruppe keine fluoreszierenden Bereichen.

Im Vergleich zu lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich an Stellen mit positiver Fluoreszenz morphologische Hinweise auf Knochengewebe. Eine trabekuläre Anordnung der Zellen in Knochenbälkchen, mit den dazwischenliegenden versorgenden Gefäßen war erkennbar. Um ossäre Strukturen lichtmikroskopisch genauer detektieren zu können, sind weitere histologische oder immunhistochemische Untersuchungen von Nöten. So könnte der immunhistochemische Nachweis der membranständigen Form der Alkalischen Phosphatase (ALP) auf eine Neusynthese von Knochen hinweisen. Neue Mineralisationsfronten würden nach Erreichen der maximalen ALP-Aktivität auftreten (*Coelho et al., 2000; Coelho und Fernandes, 2000*). Auch immunhistochemische Färbungen von osteoblastärem Kollagen I, sowie der Nachweis osteoblastärer Markerproteine wie Osteocalcin oder Osteopontin würden weitere Hinweise zur Morphologie des Gewebes geben.

#### **4.4 Zukunftsperspektiven**

Durch intensive Forschung im Bereich des Tissue Engineering wächst zusehends das Verständnis darüber. So konnten zahlreiche Autoren erfolgreich die Heilung von Knochendefekten durch präformierte, knorpelige Zell-Matrix-Konstrukte aufzeigen (*Case et al., 2003; Kim et al., 1994; Vacanti et al., 1995*). Neben vielen Ergebnissen, die positive Aussichten im Bezug auf Therapieoptionen von osteochondralen Defekten aufzeigen, bleiben jedoch weiterhin zahlreiche Probleme bestehen, für die in Zukunft Lösungen aufgezeigt werden müssen.

Ein Problem, das beim Tissue Engineering grundsätzlich nicht unbeachtet bleiben darf, ist, dass eine eventuelle neoplastische Transformation *in vitro* keiner Kontrolle durch ein Immunsystem unterliegt. In einer Studie mit MSC zeigten Zellen nach zahlreichen Passagen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, wobei die Zellen maligne transformierten und nach Implantation *in vivo* Fibrosarkome bildeten (*Miura et al., 2006*). Auch ist eine Immunreaktion nach Implantation von tissue-engineerten Konstrukten mit autologen Zellen nicht vollständig auszuschließen. So wäre es denkbar, dass der Empfängerorganismus auf Reste von FBS oder auf andere Zusätze im Kultivierungsmedium reagiert. Zur Kultivierung und Proliferation der Zellen könnte so statt FBS entweder autologes Serum oder serumfreies Medium unter Zusatz von Wachstumsfaktoren zur Anwendung kommen (*Kamil et al., 2007*).

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Defektgröße. Bislang konnten nur relativ kleine Konstrukte *in vitro* generiert werden. Limitierender Faktor ist die Nährstoffversorgung über Diffusion. Eine mögliche Lösung wäre, Konstrukte mit Gefäßen herzustellen (*Tischer et al., 2004*). Zusätzlich werden weitere Studien benötigt, um auch eine optimale Erhaltung des Zell-Matrix-Konstruktes *in vivo* zu erreichen. Entscheidender Punkt hierzu ist eine ausreichende Angiogenese (*Klompaker et al., 1996*). Erst nach erfolgreichen Versuchsreihen an Großtieren könnte dann der Übergang zu klinischen Anwendungen erfolgen.

Trotz aller Forschungsbemühungen kann es dennoch sein, dass die Qualität einer autologen osteochondralen Transplantation nicht erreicht wird. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie sagt aus, dass autogene osteochondrale Transplantate in einem Defekt in Kniegelenken von Zwergschweinen nach wie vor deutlich bessere Ergebnisse erzielen als aus Stammzellen *in vivo* hergestellte Implantate (*Chang et al., 2006*). Methodisch kritisch ist bei dieser Untersuchung allerdings, dass für das Tissue Engineering dieser osteochondralen Ersatzstücke allogene Zellen verwendet wurden.

Eine neue Entwicklung im Bereich des Tissue Engineering stellen computergestützte Verfahren, auch CATE (Computer Aided Tissue Engineering) genannt, dar. Diese Möglichkeiten gewinnen zunehmend an Bedeutung (*Sun et al., 2004*) und zielen nicht nur darauf ab, patientengerechte Konstrukte herzustellen, sondern auch darauf, dass dies in einer effizienten Art und Weise möglich ist, beispielsweise durch die gleichzeitige Kultivierung von vielen kleinen Konstrukten in einem größeren Bioreaktor (*Dvir et al., 2006*).

Alle diese Überlegungen zeigen, dass sich auf dem Gebiet des Tissue Engineering und der Physiologie osteochondraler Defekte noch viele unbekannte Möglichkeiten befinden, die in den folgenden Jahren durch intensive Forschung versucht werden zu verstehen und zu nutzen. Vielleicht lassen sich auf diesem Wege auch neue Optionen für die Therapie der Lunatumnekrose finden.

## **5 Zusammenfassung**

Die Therapie osteochondraler Defekte, wie sie beim Morbus Kienböck, einer aseptischen Knochennekrose des Os lunatum auftreten, stellt bis heute eine Herausforderung dar, da die angewandten klinischen Behandlungsmaßnahmen unbefriedigende Ergebnisse liefern. Defekte, die sowohl den Knochen, als auch seine umgebenden chondrogenen Strukturen der artikulierenden Grenzflächen betreffen, können bei einer Vielzahl von Krankheiten oder Traumen in Gelenken auftreten. Dies ist der Ausgangspunkt für das ständige Bemühen, neue biologische Behandlungskonzepte für die Therapie osteochondraler Defekte zu finden. Hierbei zeigt auch das Tissue-Engineering vielversprechende Möglichkeiten auf.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Möglichkeit, einen osteochondralen Defekt im Handgelenk, der durch Exzision des Os lunatum erreicht wurde, mit einer Trägermatrix zu behandeln, die mit multipotenten, autologen Zellen beladen war. Hierzu wurden mesenchymale Stammzellen aus dem trabekulären Knochenmark isoliert, auf Matrices aufgebracht oder zu Zellaggregaten zentrifugiert. Anschließend erfolgte deren Kultivierung in einem definierten chondrogenem Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen und die darauffolgenden histologischen und immunhistochemische Untersuchungen.

Im Tierversuch wurden Ossa lunata von 24 New Zealand White Rabbits entfernt und in den entstandenen Leerdefekt die vordifferenzierten zellbeladenen Matrices gesetzt. Zur Kontrolle wurden einer weiteren Gruppe Leermatrices ohne Zellbeladung implantiert. Den Hasen wurden in einer speziellen Abfolge subcutan Vitalfarbstoffe gespritzt. Zusätzlich wurden sie unmittelbar postoperativ sowie kurz vor Versuchsende radiologischen Untersuchungen unterzogen. Nach 2, 6 und 12 Wochen postoperativ erfolgte post mortem die Darstellung des Gefäßsystems mit einer Berliner-Blau-Lösung, sowie abschließende, histologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Defektheilung.

Die Ergebnisse zeigten, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark chondrogen differenzieren können. Die Gefäßdarstellung durch unsere Methode, sowie die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen der Vitalfarbstoffe konnten aufgezeigt werden. Bei allen Tieren mit 6 und 12 Wochen Versuchslaufzeit konnte eine vermutliche Neovaskularisation im Regenerationsgewebe beobachtet werden, die im zeitlichen Verlauf zunahm. Nach 2 Wochen zeigten sich hingegen keine Gefäßanschnitte im Regenerationsgewebe. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigte sich appositionelles Knochenwachstum vor allem zwischen dem 22. und dem 40. postoperativen Tag. In den Leerdefekten ergab sich nach 2 und 6 Wochen Versuchslaufzeit kein Hinweis auf



stattgefundenen Knochenstoffwechsel. Nach 12 Wochen konnten fluoreszierende Banden als Hinweis auf appositionelles Knochenwachstum und Knochenstoffwechsel vor allem im Zentrum des ehemaligen Defektes detektiert werden. Alle Tiere zeigten eine gute Defektfüllung mit Regenerationsgewebe.

Der Einsatz von autologen Stammzellen in der Therapie des Morbus Kienböck, sowie anderer osteochondraler Defekte, könnte neue Therapiemöglichkeiten öffnen. Weitere Forschungsreihen müssen das Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Stammzellen und die Einflüsse von Wachstumsfaktoren und Cytokinen untersuchen. Erst dann kann es möglich werden, eine klinische Anwendung des Verfahrens zu erreichen.

## **6 Literaturverzeichnis**

**Alini M**, Li W, Markvic P. The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. *Spine* 28: 446-454, 2003

**Almquist EE**, Burns JF. Radial shortening for the treatment of Kienböck's disease- a 5 to 10 year follow-up. *J Hand Surg (Am)* 7: 348-352, 1982

**Angele P**, Faltermeier H, Kujat R et al. Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115: 205-208, 1998

**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 eng* 5: 545-554, 1999

**Angele P**, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Mueller R, Nerlich M. Biodegradable Hyaluronsäureester/Gelantine Kompositmatrix zur osteochondralen Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen. *Biomaterialien* 24: 11-18, 2003

**Angele P**, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21: 451-457, 2003

**Angele P**, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R. Influence of different collagen species on physicochemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 25: 2831-2841, 2004 (1)

**Angele P**, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Füchtmeier B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R. Cyclic compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffold. *Biorheology* 41: 335-346, 2004 (2)

**Aspenberg P**, Tägli M, Kristensson C, Lidin S. Bone graft proteins influence osteoconduction. *Acta orthop Scand* 67: 377-382, 1996

**Athanasion KA**, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow van C. Interspecies comparison of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 9: 330-340, 1991

**Bail HJ**, Kolbeck S. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing. *Horm Res* 58 Suppl 3: 39-42, 2002

**Baksh D**, Song L, Turan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8: 301-316, 2004

**Banks WJ**. Supportive Tissues, Bone. In: Bakns WJ. *Applied veterinary histology*, 3<sup>rd</sup> edition. Mosby year book, Baltimore: 107-126, 1993

**Barry F**, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Exp Cell Res* 268: 189-200, 2001

**Bengoechea-Beeby M**, Cepeda-una J, Abascal-zuloaga A. Vascularized bone graft from the metacarpal for kienböck`s disease: A case report. *J Hand Surg.* 26/3: 437-443, 2001

**Blain EJ**, Gilbert S. Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro. *Arch Biochem Biophys* 396(1): 49-55, 2001.

**Blair HC**, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Glucks S. Osteoclastic bone resorbtion by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245: 855-857, 1989

**Breinen HA**, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. The effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model.. *J Bone Joint Surg (Am)* 79: 1439-1451, 1997

**Brown T**, Radin E, Martin R, Burr B. Finite element studies of some iuxta-articular stress changes due to localized subchondral stiffening. J Biomech: 11-14, 1984

**Bruns J**, Meyer-Pannwitt U, Silbermann M. The rib perichondrium. An anatomical study in sheep of tissue used as a transplant in the treatment of hyaline-cartilage defects. Acta Anat 144: 258-266, 1992

**Bruns J**, Steinhagen J. Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 2, 2000

**Bruns J**, Steinhagen J. Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität-Biologische Grundlagen. Dt. Zeitsch. Sportmed. 51(2): 42-47, 2000

**Burgeson RE**, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin Orthop 282: 250-272, 1992

**Campagnoli C**, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuona I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem /progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver and bone-marrow. Blood 98: 2396-2402, 2001

**Campoccia D**, Doherty P, Radice M et. Al. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. Biomaterials 19: 2101-2027, 1998

**Caplan AI**. Cartilage begets bone versus enchondral myelopores. Clin Orthop 261: 257-267. 1990

**Caplan AI**. The mesengenic process. Clin Plast Surg 21\_ 429-435, 1994

**Case ND**, Duty AO, Ratcliff A, Muller R, Guldberg RE. Bone formation on tissue-engineered cartilage constructs in vivo: effects of chondrocyte viability and mechanical loading. Tissue Eng 9: 587-596, 2003

**Chang CH**, Kuo TF, Lin CC, Chou CH, Chen KH, Lin FH. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatinchondroitin- hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials* 27:1876-1888, 2006

**Charboard P**, Oostendorp R, Pang W, Herault O, Noel F, Tsuji T, Dzierzak E, Peault B. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal and postnatal mouse blood-forming tissue. *Exp Hematol* 30: 1202-1210, 2002

**Coelho MJ**, Cabral AT, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. *Biomaterials* 21: 1087-1094, 2000

**Coelho MJ**, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta.glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21: 1095-1102, 2000

**Collin-Osdoby P**. Role of endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem* 55: 304-309, 1994

**Cristino S**, Grasi F, Toneguzzi S. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11- based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res* 73: 275-283, 2005

**Cunningham N**, Paralkar V, Reddi A. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11740-11744, 1992

**Cvitanich M**, Solomon M. Juvenile lunatomalacia is this Kienböck's disease? *J Hand Surg (Br)* 3: 288-292, 2004

**Daecke W**, Lorenz S, Wieloch P, Jung M, Martini AK. Vascularized Os Pisiform for replacement in Kienböck's disease: an average of 12 years follow-up-study. *J Hand Surg* 30/5: 915-922, 2005

**D'Hoore K**, De Smet L. Negative ulnar variance is not a risk factor for Kienböck's disease. J Hand Surg (Br) 19A: 229-231

**DiCorleto P**, Cimbrone M. Vascular endothelium. Atherosclerosis and coronary artery disease. Foster V, Ross R, Topol E (Hrsg.), Philadelphia, Lippincott-Raven, 387-397. 1996

**Domm C**, Fay J, Schunke M, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. Orthopäde 29: 91-99, 2000

**Donath K**, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. J Oral Pathol 11: 318-326, 1982

**Duncan H**, Jundt J, Riddle J, Pitchford W, Christopherson T: The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. J Bone Joint Surg (Am) 69: 1212-1220, 1987

**Dvir T**, Benishti N, Shachar M, Cohen S. A Novel Perfusion Bioreactor Providing a Homogenous Milieu for Tissue Regeneration. Tissue Eng 28, 2006

**El-Mowafi H**, El-Hadidi M, El-Karef E. Proximal row carpectomy: a motion-preserving procedure of advanced Kienböck's disease. Acta Orthop Belg 72: 530-534, 2006

**Francheschi LB**, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, Giavaresi G, Tschon M, Giardino R. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. J Biomed Mater Res 75A: 612-622, 2005

**Freed LE**, Vunjak-NOvakovic G, Biron RJ. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Biotechnol 12: 689-693, 1994

**Frenkel SR**, Toolan B, Menche D, Pitmand M, Pachence J. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. J Bone Joint Surg (BR) 79: 831-836, 1997

**Frenkel SR**, Di Cesare PE. Scaffolds for articular cartilage repair. J Biomedical Engineering 32(1): 26-34, 2003

**Frosch KH**, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Lohmann CH, Rabba J, Schild D, Breme J, Stuermer KM. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. J Orthop Res 21: 213-223, 2003

**Garcia-Elias M**, Vidal AM, Kienböck`s disease. Current Orthopaedics 11:28-35, 1997

**Garcia-Elias M**, An KN, Cooney WP, Linscheid RL. Lateral closing wedge osteotomy for treatment of Kienböck`s disease. A clinical and biomechanical study of the optimum correcting angle. Chir Main 17: 283-290, 1998

**Gelbermann RH**, Salomon P. Ulnar variance in Kienböck`s disease. J Bone Joint Surg 57A: 674-676, 1975

**Giunta R**, Rock C, Löwer N, Wilhelm K, Lanz U, Müller Gerbl. M. Über Beanspruchung des Handgelenks bei Mondbeinnekrose- Eine morphologische Untersuchung am Lebenden. Handchir. Mikrochir. Plastchir.30: 158-164, 1998

**Goa KL**, Benfield P. Hyaluronis acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. Drugs 47: 536-566, 1994

**Hendrickson DA**, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, Lust G. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical Progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 10: 432-463, 2002

**Horton WA**, Dwyer C, Goering R, Dean DC. Immunohistochemistry of types I and II collagen in undecalcified skeletal tissues. J Histochem Cytochem 31: 417-425, 1983

**Hoshino A**, Wallace W. Impact-Absorbing Properties of the human knee. J Bone Joint Surgery 69b: 807-811, 1987

**Huang J**, Durbhakula MM, Angele P, Johnstone B, Yoo JU. Lunate Arthroplasty with autologous mesenchymal stem cells in a rabbit model. J Bone Joint Surg (Am) 88: 744-752, 2006

**Im GI**, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. J Bone Joint Surg (Br) 83: 289-294, 2001

**Imhof H**, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. Invest Radiol 35: 581-588, 2000

**Jaiswal N**, Haynesworth SE, Caplan AL, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 64: 295-312, 1997

**Johnstone B**, Hering TM, Caplan AL, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 238: 265-272, 1998

**Junqueira LC**, Carneiro J. Histologie. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2004

**Kaigler D**, Krebsbach PH, et. al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. Tissue Eng 9: 95-103, 2003

**Kamil SH**, Kojima K, Vacanti MP, Zaporozhan V, Vacanti CA, Eavey RD. Tissue engineered cartilage: Utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 71:71-75, 2007

**Kienböck R**. Über traumatische Malazie des Mondbeins und ihre Folgezustände: Endartungszustände und Kompressions Frakturen. Fortschr Röntgenstr 16: 77-103, 1910

**Kim WS**, Vacanti CA, Upton J, Vacanti JP. Bone defect repair with tissue engineered cartilage. Plast Reconstr Surg 94: 80-84, 1994

**Kito H**, Matsuda T. Biocompatible coatings for luminal and outer surfaces of small caliber artificial grafts. J Biomed Mater Res 30: 321-330, 1996



**Kleinert JM.** Prevalence of bilateral Kienbock's disease. Correspondence Newsletter. Am Soc Surg Hand 129, 1996

**Klompmaier J,** Veth RP, et. Al. Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity. Biomaterials 17: 1685-1691, 1996

**Kolbeck S,** Bail H. Homologous growth hormone accelerates bone healing - a biomechanical and histological study. Bone 33(4): 628-637, 2002

**Kübler N.** Osteoinduktion und -reparation. Mund Kiefer GesichtsChir 1: 2-25, 1997

**Kuznetsov SA,** Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. J Cell Biol 153: 1133-1140, 2001

**Leaffer D,** Sweeney M, Kellermann LA, Avnur Z, Krstenansky JL, Vickery BH, Caulfield JP. Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS- 23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)- related- peptide (1-34), and bovine (1-34). Endocrinology 136: 3624-3631, 1995

**Li H,** Bartold PM. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation?. Endocrinology 139(9): 3855-62, 1998

**Löffler M,** Potten CS. Stem cells and cellular pedigrees – a conceptual introduction. Stem cells, C.S.Potten. London Academic Press: 1-27, 1997

**Lubiatowski P,** Kruczynski J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. Transplant Proceed 38: 320-322, 2006

**Mackay AM,** Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chisester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng 4: 415-428, 1998

**Malaval L**, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stroma cells. *J Cell Physiol* 158: 555-572, 1994

**Marks SC**, Hermey DC. The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. Acad. Press, New York 3-14, 1996

**Matsumoko AK**, Moore R, Alli P, Wigley FM. Three cases of osteonecrosis of the lunate bone of the wrist in sclerodermia. *Clinical and experimental Rheumatology* 17: 730-732, 1999

**Mayne R**, Brewton RG, Mayne PM, Baker JR: Isolation and characterization of the chains of type V/type X collagen present in bovine vitreous. *J Biol Chem* 268: 9381- 9386, 1993

**Mayr-Wohlfart U**, Waltenberger J, et.al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblast. *Bone* 30: 472-477, 2002

**Metz J**. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels, In: Erggelet C, Steinwachs M (Ed). *Gelenkknorpeldefekte*. Steinkopff Verlag Darmstadt, 3-14, 2001

**Mirabello SC**, Rosenthal DI, Smith RJ. Correlation of clinical and radiographic findings in Kienböck's disease. *J Hand Surg* 12 A: 1049-1054, 1987

**Miura M**, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24:1095-1103, 2006

**Mok CC**, Lau CS, Cheng PW, Ip WY. Bilateral Kienböck's disease in SLE. *Scand J Rheumatol*. 26(6): 485-487, 1997

**Moll KJ**, Moll M. *Anatomie*, 16. Auflage, 2000

**Mow V**, Hayes W. *Basic orthopaedic biomechanics: Friction, Lubrication and Wear of Diarthrodial Joints*. Raven Press, 1991

**Müller-Gerbl M.** The Subchondral Bone Plate. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1998

**Murgalia A,** Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to hierarchical model. J Cell Sci, 113(7): 1161-1166, 2000

**Nehrer SH,** Breinan H, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge C, Yannas I, Spector M. Canina chondrocytes seeded in type I and II collagen implants investigated in vitro. J Biomed Mater Res 28: 95-104, 1997

**Nehrer S,** Domayer S, Dorotka R, schatz K, Bindreiter U, Kotz R. Three year outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. Europ J Radiol 57: 3-8, 2006

**Noguchi T,** Oka M. Fujino M, Neo M, Yamamuro T: Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes. Comparison of allografts and isografts. Clin Orthop 302: 251-258, 1994

**Park SH,** Park SR, Chung SI, Pai KS, Min BH. Tissue-engineered cartilage using fibrin /hyaluronan composite gel and ist in vivo implantation. Artifical Organs 29(10): 838-845, 2005

**Partsch G,** Schwarzer C, Neumuller J. Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid. Z Rheumatol 48: 123-128, 1989

**Pavesio A,** Abatangelo G, Borione A. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. Novartis Found Symp 249: 203-217, 2003

**Peng H,** Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huad J. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem-cell expressed VEGF and bone morphogenetic protei-4. J Clin Invest 110: 751-759, 2002

**Pichler M**, Putz R. The venous drainage of the lunate bone. Surg. Radiol. Anat. 24: 372-376, 2002

**Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147, 1999

**Popesko P**, Rajtova V, Horak J. A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals Vol. One: Rabbit. Guinea Pig Wolfe Publishing Ltd., London, GB, 1992

**Raschke MJ**, Bail H. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. Bone 24(2): 81-8, 1999

**Recker RR**. Embryology, anatomy and microstructure of bone. In: Coe FL, Favus MJ (ed). 1992

**Redman SN**, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. Europ Cells and Materials 9: 23-32, 2005

**Reichmann E**, Gobet R, Schneider J. Tissue engineering: Utopie oder Realität? J Urol Urogynäkol 12(4): 24-27, 2005

**Ripamonti U**. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). Growth Factors 13: 273-289, 1996

**Rodgers JB**. Two lyophilized polymer matrix recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers in rabbit calvarial defects. J. Craniofac. Surg. 9: 147-153, 1998

**Roca J**, Beltran JE, Fairen MF, Alvarez a. Treatment of Kienböck's disease using a silicone rubber implant. J Bone Joint Surg ( Am) 58: 373-376, 1976

**Romeis B**, Böck P. Romeis Mikroskopische Technik, Urban und Schwarzenberg, 1989

**Rudert M**, Wirth CJ. Knorpelregeneration und Knorpelersatz. Orthopäde 27: 309-321, 1998

**Salter RB**, Simmonds DF, Malcom BW, Rumble EJ, McMichael D. The effect of continuous passive motion on the healing of articular cartilage defects-An experimental investigation in rabbits. J Bone Joint Surg (Am) 57: 570-571, 1975

**Sandell LJ**, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. Arthritis Res 3: 107-113, 2001

**Schild C**, Trueb B. Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. Exp Cell Res 274: 83-91, 2002

**Schmid TM**, Popp RG, Linsenmayer TF. Hypertrophic cartilage matrix. Type X collagen, supramolecular assembly, and calcification. Ann N Y Acad Sci 580: 64-73, 1990

**Schiltensford M**, Martini AK. Further investigation of the intraosseous pressure characteristics in necrotic lunates (Kienböck's disease). J Hand Surg 21A: 754-758, 1996

**Schumann D**, Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Weg zur Reparatur osteochondraler Defekte, Dissertation, 2004

**Setton LA**, Guilak, et. Al. Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. Clin Orthop 367: 254-272, 1999

**Shigematsu K**, Hattori K, Kobata Y, Kawamura K, Yajima H, Takakura Y. Treatment of Kienböck's disease with cultured cell-seeded hybrid tendon roll interposition arthroplasty: experimental study. J Orthop Sci. 11: 198-203, 2006

**Smith JD**, Davies N. Cyclic stretch induces the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Endothelium 8(1): 41-8, 2001

**Söntjens SHM**, Nettles DL, Carnahan MA, Setton LA, Grinstaff MW. Biodendrimer-based hydrogel scaffold for cartilage tissue repair. Biomacromolecules 7: 310-316, 2006

**Solchaga LA**, Yoo M, Lundberg M, Dennis JE, Huibregtse BA, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res* 18: 773-780, 2000

**Song L**, Tuan RS: Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J* 18(9):980-982, 2004

**Srinivas GR**, Barrach HJ, Chichester CO. Quantitative immunoassays for type II collagen and its cyanogen bromide peptides. *J Immunol Methods* 159: 53-62, 1993

**Stahl F**. On Lunatomalacia (Kienböck`s disease): A clinical and roentgenological study especially on its pathogenesis and the late results of immobilisation treatment. *Acta Chir.Scand.* 95 Suppl 126: 1-133, 1947

**Stark Y**, Suck K, Kasper C, Wieland M, Van Griensven M, Scheper T. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: 305-311, 2006

**Sun W**, Darling A, Starly B, Nam J. Computer-aided tissue engineering: overview, scope and challenges; *Biotechnol Appl Biochem* 39: 29-47, 2004

**Swieszkowski W**, Tuan BH, Kurzydowski KJ, Hutmacher DW. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomolecular Engineering* 24: 489-495, 2007

**Tamura I**, Rosenbloom J, et. Al. Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signalling pathways. *J Physiol Cell Physiol (Am)* 281: 1524-1532, 2001

**Taniguchi Y**, Tamaki T, Yoshida M. Kienböck`s disease in systemic lupus erythematosus. *Hand Surg* 7(2): 197-200, 2002

**Tischer T**, Schieker M, Stengele M, Pautke C, Neth P, Jochum M. 3D-Culturing of human osteoblastic cells with vessel like nutrient supply. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142: 344-349, 2004

**Torres DS**, Freyman TM, Yannas IV. Tendon cell concentration of collagen –GAG matrices in vitro: effect of cross-linking. *Biomaterials* 21: 1607-1619, 2000

**Urist MR**. Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893–899, 1965

**Vacanti CA**, Kim W, Upton J, Mooney D, Vacanti JP. The efficacy of periosteal cells compared to chondrocytes in the tissue-engineered repair of bone defects. *Tissue Eng* 1: 301-308, 1995

**Wakitani S**, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AL, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 76: 579-592, 1994

**Wakitani S**, Saito T, Caplan AL. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5- azacytidine. *Muscle Nerve* 18: 1417-1426, 1995

**Wang CJ**, Chen CY, Tsung SM, Chen WJ, Huang HY. Cartilage repair by free periosteal grafts in the knees of pigs: a histologic study. *J Formos Med Assoc* 99: 324-329, 2000

**Wang Y**, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ, Kaplan DL. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26: 7082-7094, 2005

**Weiss AP**, Weiland AJ, Moore JR, Wilgis EF. Radial shortening for Kienböck's disease. *J Bone Joint Surg (Am)* 73: 384-391, 1991

**Werner W**, Palmer AK. Biomechanical evaluation of operative procedures to treat Kienböck's disease. *Hand Clinics* 9, 3: 431-443. 1993

**Willers C**, Chen J, Wood D, Xu J, Zheng MH. Autologous chondrocyte implantation with bioscaffold for treatment of osteochondral defects in rabbits. *Tissue engineering* 11(7/8): 1065-1076, 2005

**Winet H.** The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone* 19: 39-57, 1996

**Wirth CJ,** Zichner L. Orthopädie und Orthopädische Chirurgie: Ellenbogen, Unterarm, Hand. Stuttgart, New York. Thieme, 2003

**Wozney JM.** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528–1534, 1988

**Yasko AW.** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint Surg. Am.* 74: 659–670, 1992

**Zenzai K,** Shibata M, Endo N. Long-term outcome of radial shortening for treatment of Kienbock's disease: a 13-25 year follow-up. *J Hand Surg (Br)* 30: 226-228, 2005





## **7 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

- |                 |            |
|-----------------|------------|
| - Name          | Pfaller    |
| - Vorname       | Carola     |
| - Geburtsdatum  | 24.03.1984 |
| - Geburtsort    | Landshut   |
| - Familienstand | ledig      |

### **Ausbildung**

- |                   |   |
|-------------------|---|
| - 1990-1994       | Grundschule Obersüßbach   |
| - 1994-2003       | Maristengymnasium Furth, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife                 |
| - 2003- 2009      | Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg                                |
| - Seit 01.01.2010 | Assistenzärztin Abteilung für Kinderchirurgie, Kinderkrankenhaus St. Marien, Landshut |

Landshut, den 18.05.2010

## **8 Danksagung**

**Mein Dank geht an alle, die mich während meiner Doktorarbeit in konstruktiver Weise unterstützt haben, im Besonderen an:**

**Prof. Dr. Michael Nerlich:** Für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Klinik durchführen zu können.

**Prof. Dr. med. Peter Angele:** Für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Erstgutachtens und für die wissenschaftliche Unterstützung.

**Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert:** Für die Übernahme des Zweitgutachtens.

**Dr. med. Arne Berner:** Für die Betreuung meiner Dissertation, die Korrekturen des Manuskripts und die intensive, kritische und stetige Beratung bei der Erstellung der Arbeit.

**Dr. rer. nat. Richat Kujat:** Für die gute Kooperation, die Herstellung der Matrices und seiner Unterstützung bei sämtlichen Angelegenheiten.

**Frau Daniela Drenkhart:** Für die immense Unterstützung bei den Zellkulturen und den histologischen und immunhistochemischen Verfahren, für ihre pragmatische Sicht-/ und Handelsweise und für ihre aufmunternden Worte in allen Angelegenheiten.

**Dr. rer. nat. Michael Scheubeck:** Für die Einarbeitung in das Verfahren der Kunststoffeinbettung.

**Dr. rer. nat. Otto Gleich:** Für die Einweisung in die Fluoreszenzmikroskopie und Bildbearbeitung.

**Abteilung für Radiologie der Universität Regensburg:** Für die Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der Röntgenaufnahmen.

**Tobias Ehrenreich, Sebastian Grau, Darius Marcinczak, Maria Fischer und Katharina Ehehalt:** Für die gute Zusammenarbeit im Labor und bei den Tierversuchen.



Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Carola Pfaller