

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

**Tissue Engineering zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen  
mit mesenchymalen Stammzellen und einer Gelatine-Hyaluronsäure-  
Kompositmatrix mit dem Wachstumsfaktor BMP-7**

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

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von**

**Markus Schaffer**

**2011**



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

**Tissue Engineering zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen  
mit mesenchymalen Stammzellen und einer Gelatine-Hyaluronsäure-  
Kompositmatrix mit dem Wachstumsfaktor BMP-7**

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

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von**

**Markus Schaffer**

**2011**

**Dekan:**

**Prof. Dr. Bernhard Weber**

**1. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. Peter Angele**

**2. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**09. 08. 2011**

**Meiner Familie und insbesondere meinen Großeltern**



## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1 <u>Einleitung</u></b>	1
<b>1.1 Meniskusschäden</b>	1
1.1.1 Aufbau der Menisken	1
1.1.2 Meniskusschäden und Behandlungsmöglichkeiten	4
<b>1.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)</b>	7
1.2.1 BMP-7 – allgemeine Einführung	7
1.2.2 BMP-Rezeptoren	8
1.2.3 Physiologische Funktionen und Anwendungen von BMPs	11
1.2.3.1 Knochenheilung mit BMP	11
1.2.3.2 Chondrogenese mit BMP	13
<b>1.3 Hypothesen</b>	16
<b>2 <u>Material und Methoden</u></b>	17
<b>2.1 Material</b>	17
2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte	17
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.3 Antikörper und Enzyme	19
2.1.4 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren	20
2.1.5 Kits	20
2.1.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren	20
2.1.7 Puffer und Lösungen	21
2.1.8 Medikamente	23
2.1.9 Tiere	23
<b>2.2 Methoden</b>	23
2.2.1 Zellkultur humaner mesenchymaler Stammzellen	23
2.2.2 Gewinnung und Kultur von mesenchymalen Stammzellen aus New Zealand White Rabbits	24
2.2.3 Herstellung und Kultivierung von Zellaggregaten ( <i>in vitro -</i> Chondrogenesemodell)	25
2.2.4 Beimpfung von Zellmatrices mit MSCs und Kultivierung	25
2.2.5 Aufbau des Serumtests	26

2.2.6	Aufbau des FGF (Fibroblast Growth Factor) - Tests	26
2.2.7	Aufbau des Versuchs zum Test der chondrogenen Differenzierung von passagierten mesenchymalen Neuseeland-kaninchenstammzellen	27
2.2.8	Aufbau des Versuchs zur Bestimmung der Dosiswirkungskurve von BMP-7	27
2.2.9	<i>In vivo</i> Analyse am Meniskusdefekt	28
2.2.10	Gewinnung der Menisen	30
2.2.11	Analytik	31
2.2.11.1	Histologische Auswertung und Färbungen	31
2.2.11.2	Verdau für Kollagen II – Elisa	33
2.2.11.3	Scoring	34
2.2.11.4	Statistik	36
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	37
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse des Serumtests</b>	37
<b>3.2</b>	<b>FGF (Fibroblast Growth Factor) – Test</b>	38
<b>3.3</b>	<b>Chondrogene Differenzierung von passagierten mesenchymalen Neuseelandkaninchenstammzellen</b>	39
<b>3.4</b>	<b>Dosiswirkungskurve für BMP-7 bei humanen MSCs</b>	40
<b>3.5</b>	<b>Dosiswirkungskurve bei mesenchymalen Kaninchenstammzellen</b>	45
<b>3.6</b>	<b>Effekt von BMP-7 auf die chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen</b>	52
<b>3.7</b>	<b>Behandlung eines Meniskusstanzdefekts <i>in vivo</i></b>	61
3.7.1	Meniskusdefektregeneration durch Behandlung mit einer zellfreien Kompositmatrix und 1 µg BMP-7	61
3.7.2	Meniskusdefektregeneration durch Behandlung mit einem nicht vorkultivierten Konstrukt aus mesenchymalen Stammzellen, einer Kompositmatrix und 1 µg BMP-7	64
3.7.3	Meniskusdefektregeneration durch Behandlung mit einem 14 Tage vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukt	67
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	71
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	79
<b>6</b>	<b><u>Literatur</u></b>	81

<b>7 <u>Anhang</u></b>	<b>91</b>
<b>7.1     Lebenslauf</b>	<b>91</b>
<b>7.2     Danksagung</b>	<b>92</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Meniskusschäden**

Läsionen im avaskulären Teil des Meniskus stellen aufgrund der fehlenden Selbstheilung nach wie vor ein ungelöstes Problem in der Traumatologie dar. Der Großteil der Meniskusverletzungen ist jedoch in diesem avaskulären Anteil lokalisiert [26]. Die derzeit übliche Behandlung solcher Verletzungen ist die arthroskopische partielle Menisektomie [73].

Nachteil sind osteoarthrotische Veränderungen, welche durch diese Behandlung induziert werden können. Hauptursache hierfür sind eine Erhöhung der auf die Gelenkflächen einwirkenden Kräfte, was eine Folge der fehlenden Belastungsverteilung und Schockabsorption durch die Menisken ist, und die daraus resultierende Schädigung des Gelenkknorpels [1, 55, 64, 67].

Bereits ein Verlust von 15-24% des Meniskus führt zu einer Steigerung des Kontaktdruckes auf die Gelenkknorpel um mehr als 350% [75]. Langfristig resultieren hieraus eine irreversible degenerative Schädigung des betroffenen Kniegelenks und eine vorzeitige Gonarthrose.

Die arthroskopische partielle Menisektomie gehört zu den am häufigsten durchgeführten Operationen in Deutschland [7], wofür u.a. die steigende Anzahl an Sportunfällen verantwortlich ist. Entsprechend bedeutend ist der durch solche Verletzungen entstehende volkswirtschaftliche Schaden [56, 76, 91].

#### **1.1.1 Aufbau der Menisken**

Die Menisken sind wichtige Strukturen des Kniegelenks, die die Belastung verteilen, Schock absorbieren und das Knie und den Bandapparat stabilisieren. Auch sind sie für die Propriozeption und die Lubrikation der Gelenkflächen essentiell [1, 55, 64]. Damit kompensieren sie teilweise die fehlende knöcherne Führung. Die beiden Scheiben sind bikonkav, an der Außenseite ca. 1,5 cm dick und in Richtung Gelenkinnenseite

keilförmig auslaufend. Die den Femurkondylen zugewandte Seite ist konkav, die dem Tibiaplateau aufliegende Seite flach. Die Menisken tragen einen Großteil der Last des Kniegelenks, da die Femurkondylen nur im Zentrum direkt auf dem Tibiaplateau ruhen, während sie in der Peripherie auf den Menisken sitzen. Sie folgen den Bewegungen des Kniegelenks indem sie sich beim Beugen nach hinten und beim Strecken nach vorne verschieben.

Der laterale Meniskus ist nahezu kreisrund und die von ihm bedeckte Tibiaoberfläche ist deutlich größer als die vom Innenmeniskus bedeckte. Er ist nur geringgradig mit dem Vorderhorn an der Eminentia interkondylaris hinter der Insertionsstelle des anterioren Kreuzbandes und mit dem Hinterhorn auf dem Tibiaplateau befestigt, so dass er sehr gut verschieblich ist. Am Femurkondylus ist er variabel über sogenannte Humphrey- und Wrisberg-Ligamente befestigt, am Ligamentum kollaterale laterale überhaupt nicht. Daraus ergibt sich eine größere Beweglichkeit im Rahmen der Flexion. Der Innenmeniskus ist C-förmig und hat über transversale Bänder im Vorderhornbereich Verbindungen zum Außenmeniskus. Sein Vorderhorn ist in der Fossa interkondylaris anterior vor der Insertion des vorderen Kreuzbandes verankert und sein Hinterhorn zwischen den Insertionsstellen von hinterem Kreuzband und Außenmeniskus. Des Weiteren ist er im Randbereich mit der medialen Gelenkkapsel sowie mit dem Ligamentum collaterale mediale über ligamentäre Fasern verbunden.

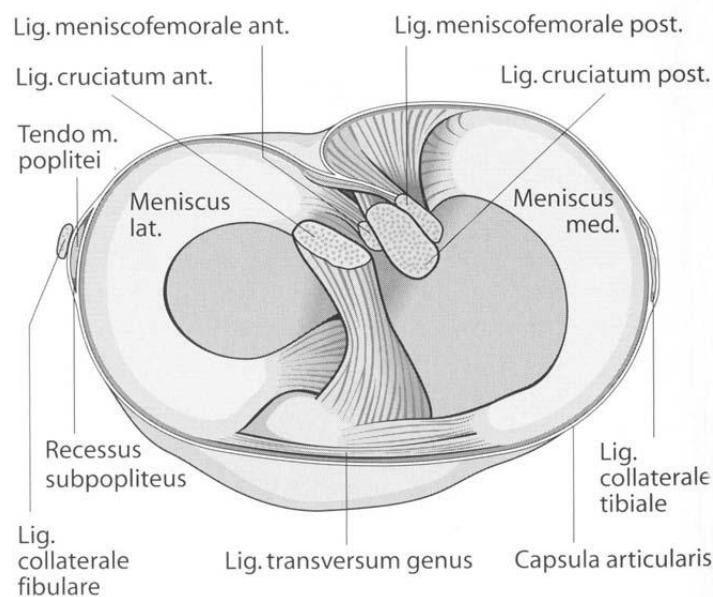


Abbildung 1.1

(Aus Weigel, Nerlich: Praxisbuch Unfallchirurgie 2004 [96], S. 594,

Abb. 10.1)

Die Menisken bestehen aus Faserknorpel und haben eine extrazelluläre Matrix aus dichten, längs verlaufenden Typ-I-Kollagen Faserbündeln. Verstärkt werden die Meniski durch radiär und quer verlaufende Fasern. Zwischen den Kollagenfasern sitzen einzelne Knorpelzellen, sowie kleine isogene Chondrozytengruppen. Die extrazelluläre Matrix der Menisken besteht des Weiteren aus Glykosaminoglykanen, welche wichtig für das elastische Verhalten und die Kompressionsfähigkeit sind [15].

Die vaskuläre Versorgung der Menisken erfolgt aus oberen und unteren Ästen der Aa. geniculares laterales und mediales, welche sich an der Meniskusbasis zu einem perimeniskalen Plexus vereinigen. Hieraus werden über kleine radiäre Äste etwa 10-25% des Außenmeniskus und 20-30% des Innenmeniskus versorgt.

Man kann die Menisken in einen vaskularisierten Teil, die sogenannte rot-rote Zone, einen avaskulären Anteil, entsprechend der weiß-weißen Zone sowie eine Intermediärzone, die rot-weiße Zone unterteilen. Zu den avaskulären Anteilen gehören die zentralen Anteile der Menisken, welche über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit ernährt werden [6].

### **1.1.2 Meniskusschäden und Behandlungsmöglichkeiten**

Meniskusverletzungen gehören zu den häufigsten orthopädischen Verletzungen, und führen im weiteren Verlauf zu einer Knorpelschädigung im Kniegelenk [15].

In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde der Meniskus zeitweise als überflüssig angesehen und als Behandlung der Wahl solcher Verletzungen eine komplette Entfernung des Meniskus durchgeführt, was zwar zu guten kurzfristigen Ergebnissen mit deutlicher Reduktion der Schmerzsymptomatik, im weiteren Verlauf allerdings zu schweren degenerativen Veränderungen des Kniegelenks geführt hat [2, 5, 29, 35, 89].

Als mit einem geringeren Verlust an Meniskusgewebe verbundener Eingriff wird heute häufig die arthroskopische partielle Meniskektomie durchgeführt. Sie führt zu einer Verbesserung der Beweglichkeit und zur Verringerung der Schmerzen. Aber auch diese Behandlungsmethode führt im langfristigen Verlauf zu Knorpeldegeneration, welche proportional ist zu der entfernten Menge an Meniskusgewebe [10, 24, 27, 29].

Es wurde auch eine Rekonstruktion des beschädigten Meniskus durch Verankerung des losen Fragments versucht. Die Ergebnisse waren aber enttäuschend, da das abgerissene Teilstück im Allgemeinen nicht mehr reinteigriert wird [14].

Ein weiterer Therapieansatz beruht auf der Beobachtung, dass Verletzungen im avaskulären Anteil des Meniskus eine deutlich bessere Heilungstendenz zeigten, wenn der vaskuläre Anteil mitverletzt war. Entsprechend konnte durch das Setzen von Verbindungskanälen von einem avaskulären Defekt in den vaskulären Anteil die Heilung verbessert werden. Es zeigte sich teilweise meniskusähnliches Gewebe, teilweise jedoch nur fibrotisches Narbengewebe [31, 105, 106].

Ebenfalls wurden die Erfolgssichten für die Verwendung von Meniskusersatzverfahren untersucht. Dazu wurden sowohl autologe Transplantate wie z.B. infrapatellares Fettgewebe [25, 61] oder Sehnen [52, 59], als auch allogene Meniskustransplantate von Leichenspendern verwendet. Diese bieten zwar einen Schutz vor degenerativen Veränderungen, die Verfügbarkeit der Transplantate ist jedoch schlecht. Außerdem haben sie infektiöse und immunologische Risiken [67, 86, 93]. Bei autologen Transplantaten konnte kein signifikanter Schutz vor degenerativen

Veränderungen gezeigt werden [33, 48, 53, 61]. Die Möglichkeit künstlicher Transplantate wie Dacron oder Teflon wurden untersucht, diese zeigten jedoch häufig Materialversagen und eine Synovitis aufgrund von Abrieb [60].

Es wurde auch versucht *in vitro* Zellen des verletzten Meniskus zur Reimplantation zu züchten. Dafür sind prinzipiell Zellen der avaskulären Zone besser geeignet, da sie mehr Glykosaminoglykane produzieren als die der vaskularisierten Zone [88, 21]. Allerdings ist die Zahl der zur Verfügung stehenden Zellen gering und die Qualität oft nicht ausreichend. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist das Setzen eines weiteren Schadens am Meniskus [67].

Auch durch die Verwendung von mit Meniskuszellen besetzten Trägermatrices aus Fibrin [95], Polyglykolsäure [44] oder Kollagen I und II [65, 66] konnte kein dem natürlichen Meniskus mechanisch gleichwertiges Gewebe hergestellt werden. Insbesondere die Verwendung von Kollagen-Matrices führt zu einer Schrumpfung auf ca. die Hälfte der Ausgangsgröße. Als Ursache hierfür wird die Expression von alpha-smooth-muscle-actin durch die Meniskuszellen, welche dadurch kontraktile Eigenschaften bekommen, angenommen [65, 66].

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen in Verbindung mit einer Kollagen- oder Fibrinmatrix, ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Hierzu gibt es sowohl Studien die eine verbesserte Heilung von avaskulären Meniskusdefekten zeigen [46, 94], als auch Studien, die keine Verbesserung feststellen [74].

Eine weitere Variante ist die Implantation von Biomaterialien zur Reparatur von Meniskusschäden, in welche Gewebe möglichst ungehindert einwachsen können und die im weiteren Verlauf abgebaut werden. Am beliebtesten sind Gewebe aus isolierten Kollagenmolekülen und künstliche, auf Polymeren basierende Matrices, welche den Vorteil haben, dass die Porengröße optimal angepasst werden kann [51, 65, 77, 92]. Klompmaker et. al. fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass für Kaninchenzellen die Porenweite im Bereich von 150-500 µm liegen sollte [51].

Zu der Verwendung von Kollagen-I-Implantaten existieren bereits klinische Studien. In diesen konnte gezeigt werden, dass bei medialen Meniskusschäden mit erhaltenem

Restmeniskus die Implantation einer solchen Matrix zu einer signifikanten Verbesserung sowohl des subjektiven Befindens als auch objektiver Scores wie dem Lysholm score [90] oder dem Tegner score [90] führt. Auch nach 5-6 Jahren wurde radiologisch kein Fortschreiten der Knorpeldegeneration festgestellt, was jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig ist, da keine Kontrollgruppe vorhanden war. Der Meniskusdefekt war nach knapp 6 Jahren aber nur noch zu durchschnittlich 69% mit Gewebe aufgefüllt, Tendenz fallend. Dieses Gewebe konnte histologisch als dem Meniskus entsprechendes Gewebe identifiziert werden [85]. Ein bislang vielversprechender Ansatz in der Reparatur von Meniskusschäden ist die Verwendung von Polyurethanmatrices. Hierzu fehlen allerdings noch Studien, welche das Verhalten dieser Materialien im längerfristigen Verlauf untersucht haben [30, 57].

Ebenfalls wurde die Verwendung von Wachstumsfaktoren getestet und es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  *in vitro* sehr effektiv die Produktion von Glykosaminoglykanen bei Meniskuszellen anregt [21]. Ebenfalls stimulierend auf die Proliferation von Meniskuszellen wirken platelet derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor und bone morphogenetic protein-2 [11, 84].

Zellner et al. untersuchten die Möglichkeiten des Tissue-Engineerings bei einem Meniskustanzdefekt im avaskulären Anteil des Außenmeniskus bei Kaninchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in einem leer gelassenen Stanzdefekt keinerlei meniskusähnliches Reparaturgewebe entsteht. Durch die alleinige Implantation einer Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix konnte lediglich im kurzfristigen Verlauf über 6 Wochen eine verbesserte Defektfüllung verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt werden, welches jedoch lediglich fibrotisches Narbengewebe darstellte [103]. Bei längerer Laufzeit konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. Auch durch die unselektive Stimulation mit Wachstumsfaktoren mittels platelet-rich-plasma oder die Besetzung der Matrix mit nativem autologem Knochenmark verbesserte die Defektfüllung verglichen mit der Kontrollgruppe nicht signifikant. Sehr viel bessere Ergebnisse konnten durch die Implantation einer mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Matrix erzielt werden. In dieser Versuchsgruppe war der Stanzdefekt mit meniskusähnlichem Gewebe gefüllt und signifikant besser als die Kontrollgruppe. Auch

die Implantation eines 14 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium vorkultivierten Stammzell-Matrix-Konstrukts zeigte sowohl makroskopisch als auch histologisch ein sehr gutes, meniskusähnliches Reparaturgewebe, welches allerdings lediglich partiell in den originären Meniskus integriert war [103].

Alles in allem ist bis heute noch keine zufriedenstellende, geschweige denn optimale Behandlung von Meniskusschäden möglich und eine degenerative Veränderung im Kniegelenk nach Meniskusverletzung kann nach wie vor kaum verhindert werden [15]. Die mitunter vielversprechendsten Therapieansätze befinden sich jedoch im Bereich des Tissue-Engineerings.

## **1.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)**

### **1.2.1 BMP-7 - allgemeine Einführung**

Das bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) gehört zur transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) Superfamilie. Ein Synonym für BMP-7 ist osteogenic protein-1 (OP-1) [38]. Die Erbinformation für dieses Protein ist auf Chromosom 20 kodiert, und zwar wahrscheinlich auf 20q13.1-q13.3 (siehe Abb. 1.2) [38]. Es wird als Vorläuferprotein synthetisiert, welches dann proteolytisch zu einem Dimer prozessiert wird. Dieses ist am C-terminalen Ende über Disulfidbrücken verbunden. Das fertige Protein hat 36 kD und ist ein Homodimer aus je 139 Aminosäuren [23].

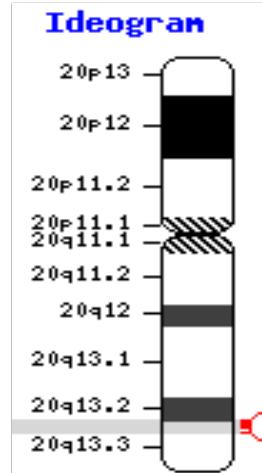


Abb. 1.2 [39] Chromosom 20 mit den für BMP-7 kodierenden Genen q13.1, q13.2 und q13.3 auf dem langen Arm des Chromosoms

### 1.2.2 BMP – Rezeptoren

Alle BMP-Subtypen wirken über transmembrane Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Von diesen BMP-Rezeptoren lassen sich zwei Hauptklassen (BMPR I, BMPR II) unterscheiden. Für die Signaltransduktion sind beide Typen von Rezeptoren notwendig, da sie einen heterotetrameren Komplex aus je zwei Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren bilden (siehe Abb.1.3) [17, 37, 97, 98]. Durch Ligandbindung wird eine intrazelluläre Signaltransduktion ausgelöst, wodurch die Genexpression moduliert wird (siehe Abb. 1.3) [8, 16, 63].

Es existieren auch BMPs (wie zum Beispiel BMP-7), welche sowohl über oben genannte Rezeptoren wirken können als auch über Activin-Rezeptoren [100].

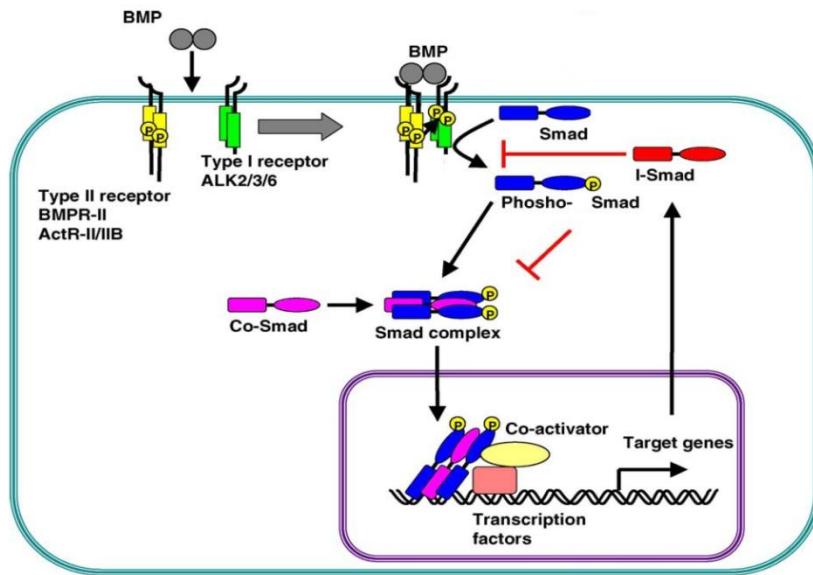


Abb.1.3 aus [63] (bearbeitet) intrazelluläre Signalkaskade des BMP-Rezeptors

Von den Rezeptoren existieren verschiedene Subtypen, die auch verschiedene biologische Wirkungen haben. Beim Typ-I-Rezeptor sind dies BMPR-IA (=„activin receptor-like kinase“ ALK3) und BMPR-IB (=ALK6), welche einander strukturell sehr ähnlich sind, sowie ALK2, welcher sich strukturell von den anderen beiden deutlicher unterscheidet [8, 12]. BMPR-IA reguliert dabei überwiegend die späten Stadien der Chondrogenese und BMPR-IB eher die früheren [109].

Für die bone-morphogenetic-proteins existieren mehrere Korezeptoren. Einer von diesen ist Transforming Growth Factor- $\beta$ -Type III Receptor (= betaglycan). Dieser ist ein Heparan-Sulfat Proteoglykan und ubiquitär vorhanden. An ihn können verschiedene Spezies der TGF- $\beta$ -Familie binden, darunter auch BMP-2 und BMP-7. Als Korezeptor erhöht er die Affinität von BMP-2 und BMP-7 für ihre Rezeptoren BMPR-IA und -IB und entsprechend führt sein Verlust zu einer verminderten Sensitivität des Gewebes für BMP [50].

Um die Aktivität der BMP-Rezeptoren zu kontrollieren sind natürlich auch Mechanismen notwendig, die diese wieder inaktivieren.

Eine Möglichkeit hierfür sind sogenannte Pseudorezeptoren, wie zum Beispiel „BMP and activin membrane-bound inhibitor“ (BAMBI). Dieser Rezeptor benötigt für seine

Expression die Anwesenheit von BMP-4, weshalb er im Sinne eines negativen Feedbacks funktionieren könnte [58, 69].

Des Weiteren existieren inhibitorische Smads (ISmads): Smad6 und Smad7. Sie konkurrieren mit den Smads, welche Proteine sind, die die intrazelluläre Signaltransduktion übernehmen, um die Aktivierung durch BMPR-I, welcher dadurch kompetitiv gehemmt wird [16, 17, 63].

Ein weiterer, die Smads und damit die Signalkaskade betreffender Regulationsmechanismus, sind die „Smad ubiquitination regulatory factors 1 und 2 (Smurf1 und Smurf2)“. Sie führen zur Ubiquitinierung, damit zur proteasomalen Degradierung und folglich der Inaktivierung von aktivierte Smads [81, 104, 107].

Neben den oben genauer erläuterten Möglichkeiten der Zellen die Wirkungen von BMP zu antagonisieren, existieren noch eine ganze Reihe weiterer (Siehe Abb. 1.4), auf welche ich aber nicht genauer eingehen werde.

- 
- |  |
|--|
| 1. Nonsignaling pseudoreceptors<br>BAMBI   |
| 2. Inhibitory Smads<br>Smad 6 and 7  |
| 3. Smad 1/5 binding proteins<br>Ski and Tob  |
| 4. Degradation of signaling Smads<br>Smurf 1 and 2   |
| 5. Extracellular antagonists of BMPs<br>Noggin, chordin, ventropitin, follistatin, and FLRG<br>Twisted gastrulation<br>Dan/Cerberus family: Dan, Cerberus, PRDC, Caronte,<br>Dante, gremlin/drm, and sclerostin/SOST |
- 

Abb. 1.4 aus [16] Proteine, welche BMP-antagonistisch wirken und so die Aktivität der Wachstumsfaktoren steuern

### **1.2.3 Physiologische Funktionen und Anwendungen von BMPs**

Eine der wichtigsten Funktionen von BMPs ist, dass sie die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in osteoblastische und chondroblastische Zelllinien und deren Migration in die Frakturzone bei Knochenbrüchen induzieren. Des Weiteren können sie bei Zellen die Apoptose induzieren, was für die normale Skelettausreifung essentiell ist. Eine physiologische Skelettausreifung ist ohne BMPs nicht möglich [16, 17, 23, 32].

Ähnliche Effekte wie bei der Osteogenese zeigen BMPs auch bezüglich der Chondrogenese. Sie steigern die Funktionstätigkeit der Chondrozyten und führen zu einer gesteigerten Expression von Kollagen Typ II und Typ X, sowie weiterer knorpel-spezifischer Proteine [17]. Sie sind essentiell für eine chondrogenetische Differenzierung von Zellen. Eine Differenzierung von Knorpelvorstufen in Chondrozyten findet ohne die Anwesenheit von BMPs nicht statt [101].

Selbstverständlich unterliegt die Steuerung der Osteogenese und der Chondrogenese nicht den Bone Morphogenetic Proteins alleine, sondern es sind eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren mitbeteiligt [17]. Auf manche dieser Wachstumsfaktoren wirkt wiederum BMP-7 modulierend [20, 45].

Neben den Wirkungen auf Knorpel und Knochen haben die BMPs auch Wirkungen auf Organe, die nicht dem Skelettsystem zugehörig sind, wie z.B. das Herz oder die Nieren [87, 102].

#### **1.2.3.1 Knochenheilung mit BMP**

Für klinische Anwendungen stehen derzeit zwei BMPs zur Verfügung: rekombinantes humanes BMP-2 und rekombinantes humanes BMP-7 [13].

In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass bei diaphysären Knochendefekten durch BMP-7 in Verbindung mit einem Trägermaterial vergleichbare oder sogar bessere Erfolge als durch autogene Knochentransplantate, die nach wie vor

der Goldstandard sind, erreicht werden können. Des Weiteren konnten sogar dann noch Erfolge erzielt werden, wenn die Defekte durch ein autologes Transplantat nicht mehr geheilt werden konnten, bzw. eine Heilung aufgrund von Risikofaktoren fraglich war [13, 23, 32]. Auch bei Tibiaschaftpseudarthrosen konnte unter der Verwendung von BMP-7 eine bessere Heilungsrate erzielt werden [108].

Bei der natürlichen Heilung von Frakturen spielen BMPs, u.a. auch BMP-7 eine große Rolle: bereits wenige Tage nach der Fraktur kann eine deutliche Hochregulation der Expression in Osteoblasten an den Frakturenden beobachtet werden. Dieser natürliche Heilungsprozess kann vermutlich durch die Injektion von BMP verbessert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Injektion von BMP-2 zu einer beschleunigten Frakturheilung führt [13, 23, 70]. Diese Wachstumsfaktoren werden bisher allerdings klinisch nur dann verwendet wenn alle konventionellen Behandlungsmöglichkeiten ausgeschöpft sind [32].

Allein durch die subkutane Applikation von BMP-7 auf einem Kollagen-Trägermaterial in Ratten konnte die Bildung von funktionell wie auch histologisch natürlichem Knochen über Chondrozytenvorstufen erreicht werden. In Abwesenheit von BMP-7 hingegen wurden die Kollagenmatrices resorbiert und es fand keine Knochenbildung statt [80].

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die chondro- und osteogenetische Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluss von BMP-7 konzentrationsabhängig ist. Vergleichbare Effekte konnten auch für knochenspezifische Marker wie Osteokalzin beobachtet werden. Für eine regelrechte osteo- oder chondrogenetische Differenzierung ist des Weiteren eine kontinuierliche Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren über mehrere Tage notwendig [82].

Es wurden auch die Unterschiede zwischen unspezifischer Stimulation durch die in platelet-rich-plasma enthaltenen Wachstumsfaktoren und der spezifischen Stimulation durch BMP-7 in einer Studie verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Knochenbildung durch BMP-7 deutlich stärker stimuliert wurde als durch platelet-rich-plasma, welches keine signifikanten osteoinduktiven Effekte zeigte. Den stärksten Effekt zeigte BMP-7 in Verbindung mit einer Trägermatrix, in diesem Fall

anorganischem Rinderknochen. Unter diesen Bedingungen konnte auch eine deutlich bessere Osteointegration von applizierten Schraubendentalimplantaten beobachtet werden [78, 79]. Ein weiterer möglicher Anwendungsbereich von BMPs ist die Wirbelversteifung. Im Tiermodell zeigte die Verwendung einer Kollagen-Typ-I-Trägermatrix mit BMP-7 deutlich bessere Ergebnisse als die herkömmliche Verwendung eines Autotransplantats: Die Fusion ging deutlich schneller vonstatten und die mechanische Stabilität war zu jedem Zeitpunkt höher als die des Autotransplantats. Die Kollagen-Trägermatrix allein zeigte nur eine minimale Stabilität. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam man bei einer Patientenstudie mit BMP-2 und ebenfalls einer Trägermatrix aus Kollagen. Hier zeigte sich zudem eine geringere Operationszeit, geringerer Blutverlust und eine bessere Fusionsrate. Der posttherapeutische Schmerzscore und der neurologische Status waren identisch [13, 23].

### **1.2.3.2 Chondrogenese mit BMP**

BMP-7 steigert den Metabolismus von Chondrozyten und die Proteinsynthese ohne jedoch zu unkontrolliertem Zellwachstum zu führen. Ein Mechanismus über den BMPs das Knorpelwachstum fördern ist die Hochregulation von N-Cadherin und folglich die Förderung von Zell-Zell-Interaktionen [34]. Sie regulieren die Synthese von Matrixproteinen und hemmen den Chondrozyten-Katabolismus [19].

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Injektion von BMP-7 bei einem akuten Knorpeltrauma die Zahl der apoptotischen Zellen reduzieren kann. In einem *in vivo*-Modell konnte durch die posttraumatische Injektion von BMP-7 in das betroffene Gelenk die Ausbildung einer posttraumatischen Osteoarthritis verhindert werden [19, 42]. Dies findet auch physiologischerweise statt: nach Verletzungen, chirurgischen Interventionen oder Arthritis können erhöhte Konzentrationen von BMP-7 in der Synovialflüssigkeit gemessen werden. Soweit derzeit bekannt ist BMP-7 das einzige Mitglied der BMP-Familie, das sowohl anabol, als auch anti-katabol wirkt.

Wahrscheinlich hemmt BMP-7 die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 und folglich auch MMP-1 und MMP-13 [19].

BMP-7 wird lebenslang von den Knorpelzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase des Knorpels. Diese Genexpression nimmt mit zunehmendem Alter jedoch deutlich ab. Der Mangel an BMP-7 prädisponiert den Knorpel für degenerative Prozesse und macht ihn empfindlicher für katabole Einflüsse [19].

Unter dem Einfluss von BMP-7 und auch BMP-2 konnte eine Differenzierung von synovialen mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten beobachtet werden. Bei den sich differenzierenden Zellen handelt es sich um so genannte „side-population“-Zellen. Dies sind Zellen mit multipotenter Fähigkeit zur Differenzierung [99]. Auch die Produktion von knorpeltypischen Matrixproteinen konnte nachgewiesen werden [83]. Diese Differenzierung war sowohl für BMP-2 als auch für BMP-7 dosisabhängig. Der stärkste Effekt konnte für BMP-7 bei 200 ng/ml nachgewiesen werden [83]. Für den Glykosaminoglykangehalt konnte der stärkste Anstieg durch die kombinierte Anwendung von BMP-7 und TGF-β1 gezeigt werden, während der alleinige Zusatz von BMP-7 eher zu einer Hypertrophie der Zellen führt [62].

BMP-7 kann aber nicht nur wie oben schon beschrieben die Apoptose von Knorpelzellen reduzieren, sondern auch die Reparatur schon vorhandener Knorpeldefekte fördern. An einem Kaninchenmodell konnte demonstriert werden, dass 12 Wochen nach Setzen eines chondralen Defektes in der mit BMP-7 behandelten Versuchsgruppe intakter Gelenkknorpel entstanden ist. Im Gegensatz dazu konnte in der Kontrollgruppe lediglich fibröses Gewebe nachgewiesen werden [23].

Selbstverständlich kann man nicht erwarten, dass ein Wachstumsfaktor alleine zur optimalen Knorpelheilung führt. So konnte gezeigt werden, dass das zusätzliche setzen von Mikrotraumen durch das Durchstoßen der Kortikalis des subchondralen Knochens mit Nadeln die posttherapeutischen Ergebnisse deutlich verbessert. Sowohl die überdeckte Fläche als auch die Dicke des neu gebildeten Knorpels war größer als unter der alleinigen Verwendung von BMP-7. Der gebildete Knorpel war in diesem Fall allerdings sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht völlig dem physiologischen Gelenkknorpel entsprechend [54].

Aufgrund der bisherigen, sehr vielversprechenden Ergebnisse im Einsatz von BMP-7 zur Reparatur von Gelenkknorpelschäden ergibt sich die Frage, ob der Wachstumsfaktor auch erfolgreich in der Behandlung von Meniskusschäden, welcher ebenfalls aus Knorpelgewebe besteht, eingesetzt werden kann. Aufgrund der bislang fehlenden Erkenntnisse auf diesem Gebiet haben wir dies zu untersuchen als Ziel der Arbeit gesetzt, wofür wir die folgenden Hypothesen erstellt haben.

**1.3 Hypothesen:**

1. BMP-7 verbessert die chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro*.
2. BMP-7 verbessert dosisabhängig die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Kaninchen-Stammzellen *in vitro*.
3. Die einmalige Zugabe von BMP-7 zu einer in einen Meniskusstanzdefekt im avaskulären Bereich implantierten zellfreien Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix verbessert *in vivo* die Defektheilung.
4. Die einmalige Zugabe von BMP-7 zu einer mit mesenchymalen Stammzellen besetzten und in einen Meniskusstanzdefekt im avaskulären Bereich implantierten Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix verbessert die Defektheilung *in vivo*.
5. Die Implantation eines für 14 d in chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von BMP-7 vorkultivierten Konstrukts aus einer Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix und mesenchymalen Stammzellen in einen Meniskusstanzdefekt im avaskulären Bereich verbessert die Defektheilung *in vivo*.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Biopsie-Stanzen 2mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Brutschrank CO <sub>2</sub> Heracell 240	Heraeus, Hanau
Combitips plus biopur	Eppendorf, Hamburg
Cups (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (24 x 32mm, 24 x 40mm, 24 x 50mm)	Roth, Karlsruhe
Einwegspritzen (5,10 ml)	Braun, Melsungen
Express Pipettierhilfe	Falcon BD, Heidelberg
Plattenreader Genios	Tecan, Crailsheim
Kanülen (18 G, 20 G)	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc, Rochester
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Melatronic 23 Autoklav	Melag, Berlin
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Weimar
Mikroskop Fluovert FU	Leitz, Weimar
Mikroskopkamera DMC 2	Polaroid, Offenbach
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Needle, 23GA 1/2"	Kahnetics, Bloomington
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Objektträger	Knittel, Braunschweig
Pasteur-Pipetten Glas 230 mm	VWR Int., Darmstadt
pH-Meter	Knick, Berlin

Pipetten, Costar Stripette (5,10,25,50 ml)	Corning, Corning USA
Pipetten (5,10,25,50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipetten (10,100,1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen epTips filter (10,100,1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10,100,1000µl)	Biozym Scientific, Oldenburg
Power Gen 1000	Fisher Scientific, Schwerte
Präzisionswaage	Kern, Balingen-Frommern
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen
Skalpelle Nr. 11	Feather, Köln
Sterilfilter Steriflip 50ml	Millipore, Billerica
Verdauröhrchen 8,5 mm	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia
Waage EG 600-2M	Kern, Balingen-Frommern
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Falcon BD, Heidelberg
Zellkulturschalen (24 Well)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturschalen (96 Well)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkultur-V-Platten (96 Well)	Nunc, Rochester
Zentrifuge Multifuge 3S	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400	G-Kisker, Steinfurt
Zentrifugenröhrchen (15,50 ml)	Falcon BD, Heidelberg

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Albumin, bovine (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Biocoll seperating solution Dichte 1,077	Biochrom, Berlin

Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidine 3,3' (DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
D+Saccharose	Roth, Karlsruhe
DePex	Serva, Heidelberg
Elastase	Roche, Mannheim
Gelatine von Procine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
HCL	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Karion Sorbitol-Lösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Pepsin	Fluka, Buchs, Schweiz
Propanol	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Tokyo
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tryptanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt

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

### 2.1.3 Antikörper und Enzyme

Anti-Collagen Type I Mouse IgG	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Collagen Type II Mouse IgG	Merck, Darmstadt
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-	Dianova, Hamburg
Anti-Mouse IgG H+L	

#### 2.1.4 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren

Fetal Bovine Serum	PAN Biotech, Aidenbach
Goat Serum	Dako, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose + Phenolrot	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose + Phenolrot	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
PBS Dulbecco's (1x)	PAA, Pasching
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
Penicillin, Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe

#### 2.1.5 Kits

ABC-Kit	Vectorlabs, Burlingame
Alkalische Phosphatase Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
Native Type II Collagen Detection Kit	Chondrex Inc, Redmond USA
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Molecular Probes Inc, Eugene USA

#### 2.1.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren

Bone Morphogenetic Protein-7	wurde freundlicherweise von Dr.Dr. Roldàn vom Lehrstuhl für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt
------------------------------	--

Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Fibroblast Growth Factor (FGF)	R&D Systems, Wiesbaden
ITS+3	Sigma Aldrich, Steinheim
Transforming Growth Factor- $\beta$ 1	R&D Systems, Wiesbaden
Dexamethason (Stock)	0,00392g Dexamethason in 10ml 100% Ethanol
Dexamethason (Gebrauch)	200 $\mu$ l Stocklösung, 19,8 ml DMEM Low glucose (PAN – Phenolrot)

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Acetatpuffer für BMP-7	5 g Mannitol, 0,1 g Natrium Acetat Trihydrat 80ml steriles Wasser, pH mit Essigsäure auf $4,45 \pm 0,05$ einstellen (mit sterilem Wasser auf 100ml Endvolumen auffüllen); 0,2 $\mu$ m sterilfiltrieren
Blockingpuffer für Immunhistochemie	60 ml Aqua dest., 2400mg NaCl (0,8%), 120 ml Tris 0,2 M (0,08 M), 60 ml Triton X100 (0,8%), 30 ml Goat serum (10%), 30 ml FCS (10%)
DAB-Stammlösung	0,5% Diaminobenzidin in 0,1 % BSA in A.d.
DAB-Arbeitslösung	1000 $\mu$ l DAB/BSA, 6 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, 240 $\mu$ l Ni/Co Stammlösung, 9000 $\mu$ l m-PBS (0,1M)
McIlvaine-Puffer	21 g 0,1M Zitronensäure, 35,6 g 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> auf 2l

	Aqua dest., pH 3,6
m-PBS-Puffer (1M)	47,2 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O, 36,0 g NaCl, 6,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O mit A.d. auf 500g auffüllen, pH 7.0 – 7.4
Ni/Co-Stammlösung	10 mg BSA, 5 mg CoCl <sub>2</sub> , 100 mg NiCl <sub>2</sub> , 10 ml H <sub>2</sub> O
PBS	150mM NaCl, 8mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.3
Pepsinlösung 0,1%	1 mg Pepsin in 1 ml McIlvaine- Puffer
Phosphatpuffer 0,2 M	Dinatriumhydrogenphosphat 5 Teile, Natriumdihydrogenphosphat 1 Teil, pH 7,4
TBS 10x	0,55 g CaCl <sub>2</sub> , 11,688 NaCl, 12,144 g Tris-base, auf 100 ml Aqua dest. Auffüllen, pH auf 7,8-8,0 einstellen
TBS 1x	Verdünnung von TBS 10x mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10
Tris-Puffer 0,2M	24,228 g Tris base, auf 1000 ml mit Aqua dest. pH mit HCL auf 7.0 einstellen
Waschpuffer für Immunhisto	24,96 g NaCl, 780 ml Tris 0,2M, 2220 ml Aqua dest. (Gesamt 3000ml)

## 2.1.8 Medikamente

Heparin	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ketamin 10%	WDT, Garbsen
Pentobarbital (Narcoren)	Merial GmbH, Hallbergmoos
Xylazin 2%	Serumwerk, Bernburg

## 2.1.9 Tiere

## New Zealand White Rabbits (2,5-3,5 kg) Harlan und Winkelmann, Borchen

Gehalten wurden die Tiere im Tierstall des Klinikums der Universität Regensburg im Forschungsbau H4.

## 2.2 Methoden

### **2.2.1 Zellkultur humaner mesenchymaler Stammzellen**

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg wurde Knochenmark von Patienten, deren schriftliche Einwilligung vorlag und eine Beckenkammspanentnahme im Rahmen einer Spondylodese notwendig war, entnommen. Dies erfolgte durch Aspiration mit einer Kanüle im Rahmen der Spanentnahme. Dem Aspirat wurde DMEM-low glucose Medium zugesetzt. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation über einen Ficollgradienten. Nach Auszählung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen je Zellkulturflasche in DMEM-low glucose Medium (mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Hepes-Puffer) ausgesät und bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigt kultiviert. Bis zur 80%igen Konfluenz wurde

das Medium zweimal pro Woche gewechselt. Die Versuche wurden mit einmal passagierten Zellen durchgeführt.

### **2.2.2 Gewinnung und Kultur von mesenchymalen Stammzellen aus New Zealand**

#### **White Rabbits**

Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark des Beckenkamms von New Zealand White Rabbits gewonnen. Hierzu erfolgte zuerst die Narkotisierung der Kaninchen mit 2 ml Ketamin, 2 ml Xylazin i.m. gluteal mit einer 20G-Kanüle. Anschließend wurde das Fell über den Beckenkämmen rasiert, die Haut mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit einem Lochtuch steril abgedeckt. Die Haut wurde mit einem 11er Skalpell auf ca. 1-2 cm Länge inzidiert, die Faszie gespalten und die Beckenkämme dargestellt. Die Kortikalis wurde mit einer 18G-Kanüle durchstoßen und mit einer heparinisierten Spritze ca. 4 ml Knochenmark je Seite aspiriert. Abschließend wurden sowohl die Faszie als auch die Haut mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen und die Wunde mit Braunovidon-Salbe versorgt.

Die auf oben beschriebene Weise gewonnenen Zellen wurden sofort für die Kultivierung verarbeitet. Dazu wurden sie in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 15 ml Zellmedium DMEM low glucose-Medium (10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Hepes-Puffer) hinzugegeben und resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1700 U/min für 5 Minuten. Der Überstand wurde bis auf 10 ml Restvolumen entfernt und die Zellen mit Hilfe der Neubauerzählkammer ausgezählt. Dazu wurden ca. 25 µl der Zellsuspension entnommen und in ein Eppendorfcup überführt. Diesen wurde 100 µl Essigsäure 4% zur Erythrozytenlyse und 75 µl Zellmedium zugegeben. Anschließend wurden  $20 \cdot 10^7$  Zellen je  $75 \text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit 15 ml DMEM low glucose-Medium ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , wasserdampfgesättigt kultiviert.

Der Medienwechsel erfolgte zweimal pro Woche bis zum Erreichen der Konfluenz, was nach etwa drei bis vier Wochen der Fall war.

### **2.2.3 Herstellung und Kultivierung von Zellaggregaten (*in vitro* - Chondrogenesemodell)**

Nach Erreichen der Konfluenz der am Zellkulturflaschenboden adhärenten mesenchymalen Stammzellen erfolgte die Ernte und Weiterverarbeitung der Zellen. Hierzu wurde als erstes das Zellmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml PBS Dulbecco's (1x) nachgespült. Anschließend wurde der komplette Zellrasen mit 3 ml Trypsin bedeckt und inkubiert bis sich alle Zellen abgelöst haben. Dies erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Dann wurde das Trypsin mit 10 ml serumhaltigem Medium abgestoppt, in ein 50 ml Zentrifugenrörchen überführt und bei 1000 U/min 10 Minuten lang abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM high glucose erneut resuspendiert und ausgezählt. Nach der jeweiligen Aggregatzahl wurden die Zellen entsprechend der Differenzierungsgruppen auf 15 ml Zentrifugenrörchen verteilt und zwar 200.000 Zellen je Aggregat bei humanen Stammzellen bzw.  $4 \times 10^6$  Zellen je Aggregat bei Kaninchenzellen. Nach erneutem Abzentrifugieren für 10 Minuten bei 1000 U/min wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl pro Aggregat des jeweiligen Differenzierungsmediums resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 300 µl pro Well auf eine 96-Well-V-Platte aufgetragen und die Platte abschließend für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigt bei den Entnahmenzeitpunkten Tag 1, Tag 21 (und teilweise Tag 7, Tag 14).

### **2.2.4 Beimpfung von Zellmatrices mit MSCs und Kultivierung**

Nach Erreichen der zellulären Konfluenz wurden die mesenchymalen Stammzellen wie für die Herstellung von Zellaggregaten geerntet und ausgezählt (s.o.). Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in 20 µl des Differenzierungsmediums und die Beimpfung der Matrix durch Injektion der Zellen in das Zentrum der Matrix mittels einer eigens dafür aus einer 23 GA  $1/2$ " Nadel sowie einer 200 µl Pipettenspitze

hergestellten Beimpfkanüle, bis diese durchtränkt war. Für die Adhäsion der Zellen wurden die beimpften Matrices für 60 Minuten ohne Zugabe von Zellmedium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einer 24 Well Platte inkubiert, wobei nur die zentralen Wells mit Matrices besetzt wurden und in die randständigen Wells je 0,5 ml PBS Dulbecco's gefüllt wurden um ein Austrocknen der Matrices zu verhindern. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit erhielt jede Matrix 1,5 ml des jeweiligen Differenzierungsmediums. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Nach 14 Tagen Kultivierung bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigt erfolgte die Überführung in die Meniskusstanzdefekte.

### **2.2.5 Aufbau des Serumtests**

Nach Gewinnung und Aufreinigung der mesenchymalen Kaninchenstammzellen in der oben beschriebenen Weise wurden die Zellen jeder Zellreihe in mehrere Gruppen eingeteilt, von welchen jede ein anderes Testserum (FBS) in das Kulturmedium bekam. Um Unterschiede zwischen verschiedenen Zellreihen auszuschalten wurde dies mit denselben Seren parallel mit mehren Zellreihen durchgeführt. Sofort in der jeweiligen Flasche ein Zellwachstum stattfand wurde dieses beurteilt, die Zellen geerntet, zu Zellaggregaten verarbeitet und für 21 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF-β1 weiterkultiviert. Die erreichte Differenzierung wurde mittels Glykosaminoglykanfärbung und Immunhistochemie auf Kollagen-II beurteilt.

### **2.2.6 Aufbau des FGF (Fibroblast Growth Factor) – Tests**

Nach Gewinnung und Aufreinigung der mesenchymalen Kaninchenstammzellen in der oben beschriebenen Weise wurden die Zellen jeder Zellreihe in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt DMEM-low glucose Medium (mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Hepes-Puffer), die andere Gruppe erhielt zusätzlich bei jedem Medienwechsel FGF in das Zellmedium. Fand ein ausreichendes Zellwachstum

statt so wurde dieses beurteilt, die Zellen geerntet und zu Zellaggregaten verarbeitet. Nach weiterer Kultivierung für 21 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 wurden die Aggregate hinsichtlich ihrer chondrogenen Differenzierung mittels Glykosaminoglykanfärbung, alkalischer Phosphatase-Färbung sowie mittels Immunhistochemie auf Kollagen II untersucht.

#### **2.2.7 Aufbau des Versuchs zum Test der chondrogenen Differenzierung von passagierten mesenchymalen Neuseelandkaninchenstammzellen**

Nach Gewinnung und Aufreinigung der mesenchymalen Kaninchenstammzellen in der oben beschriebenen Weise wurden die Zellen jeder Zellreihe bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin erfolgte das Abtrypsinieren und Auszählen der Zellen. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Zellen zu Zellaggregaten verarbeitet und in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 21 Tage kultiviert. Die restlichen Zellen wurden in Zellkulturflaschen ( $2 \times 10^6$  Zellen je Flasche) ausgesät und erneut bis zur Konfluenz kultiviert, so dass man Zellen der ersten Passage erhielt. Daraufhin wurde erneut oben genanntes Procedere durchgeführt, wodurch man Zellaggregate der ersten Passage erhielt sowie Stammzellen der zweiten Passage. Diese Zellen der zweiten Passage wurden ebenfalls bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend zu Zellaggregaten verarbeitet. Die Beurteilung der chondrogenen Differenzierung erfolgte auch in diesem Fall mittels Glykosaminoglykanfärbung sowie Kollagen II-Immunhistochemie.

#### **2.2.8 Aufbau des Versuchs zur Bestimmung der Dosiswirkungskurve von BMP-7**

Nach Gewinnung und Anzucht von mesenchymalen Stammzellen bis zur Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und ausgezählt. Die Zellen jeder Zellreihe wurden nach dem Schema in Abb. 2.1 in 12 Gruppen unterteilt. Die Kultivierung der Zellaggregate

erfolgte für 21 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe der jeweiligen Konzentration der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1 und BMP-7 (siehe Abb. 2.1). Die Auswertung der für jede Konzentration erreichten Differenzierung erfolgte mittels Histologie, Immunhistochemie sowie quantitativ Kollagen II-ELISA.

TGF- $\beta$ 10 ng/ml	ohne TGF- $\beta$
BMP-7 0 ng/ml	BMP-7 0 ng/ml
BMP-7 5 ng/ml	BMP-7 5 ng/ml
BMP-7 10 ng/ml	BMP-7 10 ng/ml
BMP-7 50 ng/ml	BMP-7 50 ng/ml
BMP-7 100 ng/ml	BMP-7 100 ng/ml
BMP-7 200 ng/ml	BMP-7 200 ng/ml

Abb. 2.1 Gruppeneinteilung der Dosiswirkungskurve

### **2.2.9 In vivo Analyse am Meniskusdefekt**

Die Neuseelandkaninchen wurden mit 2 ml Ketamin 10% und 2 ml Xylazin 2% mittels glutealer i.m. Injektion narkotisiert und in Rückenlage positioniert. Nach Rasur des Fells und sterilem Abdecken des OP-Gebiets erfolgten der Hautschnitt (Abb. 2.2) und die parapatellare Längsinzision vom distalen Femurdrittel bis zur Tuberositas tibiae sowie die Resektion des Hoffaschen Fettkörpers. Nach Eröffnung der Gelenkkapsel wurde der anterolaterale Anteil proximal teilweise von der lateralen Femurkondyle gelöst und die Gelenkkapsel von der anterioren Kante des lateralen Seitenbandes disseziert. (Abb. 2.3)



Abbildung 2.2 Hautschnitt



Abbildung 2.3 Blick in das Kniegelenk  
nach Eröffnung der Gelenkkapsel

Anschließend wurde der laterale Meniskus nach anterior luxiert und mit einer Stanze ein 2 mm im Durchmesser großer Defekt im avaskulären Bereich der Pars intermedia des Meniskus gesetzt. (Abb. 2.4) Dieser wurde wie folgt mit Gelatine-Hyaluronsäure-Matrices bestückt (Abb. 2.5):

Gruppe 1: Zellfreie Matrix + 1 µg BMP-7

Gruppe 2: MSC-Matrix-Konstrukt + 1 µg BMP-7

Gruppe 3: MSC-Matrix-Konstrukt in chondrogenem Zellkulturmedium mit 100 ng/ml BMP-7 für 14 Tage vorkultiviert

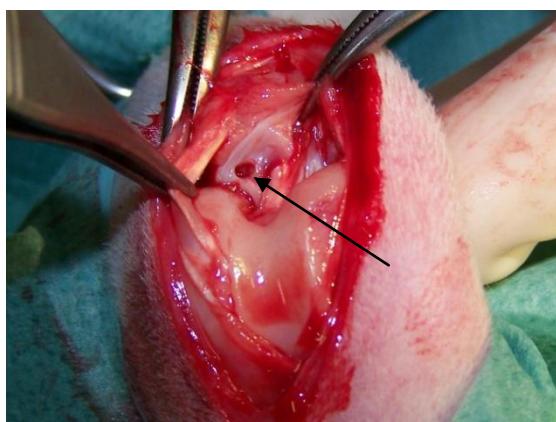


Abbildung 2.4 Nach anterior luxierter  
Außenmeniskus mit 2mm Stanzdefekt  
in der avaskulären Zone (Pfeil)

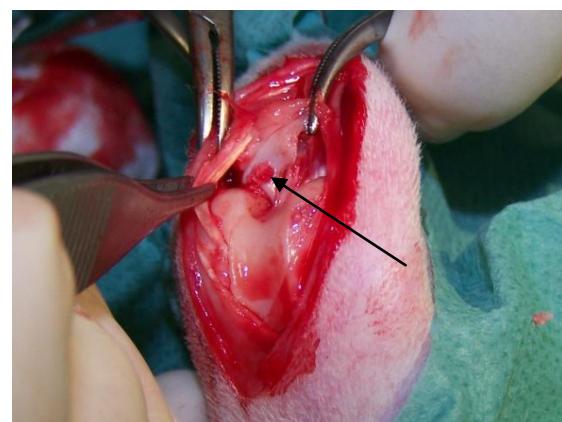


Abbildung 2.5 Mit einer Matrix  
besetzter Stanzdefekt (Pfeil)

Die Zugabe des BMP-7 in den Versuchsgruppen 1 und 2 erfolgte durch Injektion exakt auf die bereits in den Meniskusstanzdefekt platzierte Matrix (Abb. 2.6), so dass sicher davon ausgegangen werden konnte, dass exakt 1 µg BMP-7 auf die Matrix gegeben wurde. Hierzu wurde 1 µg BMP-7 in 20 µl Puffer verdünnt.

Im kontralateralen Meniskus wurde in allen Gruppen eine zellfreie Matrix als Kontrolle implantiert.

Anschließend erfolgten die Reposition des Außenmeniskus und die Readaptation der anterolateralen Kapsel in anatomischer Position mit resorbierbarem Nahtmaterial 4-0. Die Gelenkkapsel wurde ebenfalls mit 4-0 resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen.

Mit dem gleichen Nahtmaterial erfolgte die intrakutane Hautnaht (Abb. 2.7).

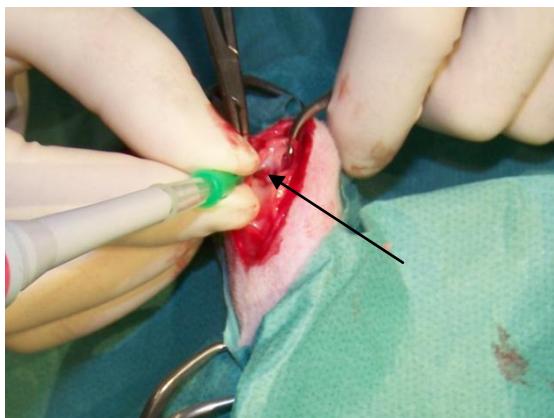


Abbildung 2.6 Applikation von 1 µg  
BMP-7 auf die implantierte Matrix (Pfeil)



Abbildung 2.7 Postoperativer Situs

Die Laufzeit betrug bei allen 3 Versuchsgruppen 3 Monate.

## **2.2.10 Gewinnung der Menisken**

Zur Analyse der erreichten Meniskusreparatur wurden die Neuseelandkaninchen wie bei der primären Operation zur Matriximplantation narkotisiert und anschließend durch eine Überdosis Pentobarbital (Narcoren), welches über eine Ohrvene

verabreicht wurde, getötet. Anschließend erfolgte die Querdurchtrennung der Patellarsehne, der Kollateral- und Kreuzbänder sowie der Kapselstrukturen, um die Außenmenisken entnehmen zu können. Die entnommenen Menisken wurden nach makroskopischer Beurteilung photographiert und der weiteren Analytik zugeführt.

## **2.2.11 Analytik**

### **2.2.11.1 Histologische Auswertung und Färbungen**

Die Aggregate und Matrices wurden nach Ende der jeweiligen Laufzeit für die histologische Auswertung mit Standardfixans (Paraformaldehyd unter erhitzen in Wasser gelöst und anschließend 1:1 mit 0,2 mol Phosphatpuffer verdünnt) für 1h (Aggregate) bzw. 4h (Matrices) fixiert. Nach dem Auswaschen des Fixans mit Phosphatpuffer 0,1 M für 30 Minuten wurden die Proben in eine Saccharoselösung mit aufsteigender Konzentration (10%, 20%, 30%) überführt, bevor zu der 30%igen Saccharoselösung für mindestens 24h die Hälfte des Gesamtvolumens Tissue Tek zugegeben wurde. Die Proben wurden mit reinem Tissue Tek eingeblockt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Von diesen Blöcken wurden 10-12 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen, den verschiedenen Färbungen zugeführt und ausgewertet.

#### **DMMB-Färbung**

Aus den Schnitten wurde in einem ersten Schritt das Tissue Tek durch Eintauchen in Aqua dest. für 5 Minuten ausgewaschen. Daraufhin direktes Umsetzen in 0,1 % DMMB (Dimethylmethylenblau) für weitere 5 Minuten. Nach Auswaschen der Farblösung durch mehrmaliges Eintauchen in Aqua dest. erfolgte der Entzug des Wassers in einer aufsteigenden Propanolreihe (96%, 100%) und abschließend 100% Xylol. Abschließend wurden die Präparate mit DePex eingedeckelt.

### Alkalische Phosphatase-Färbung

Als erster Schritt erfolgte ebenfalls das Auswaschen des Tissue Tek von den Objektträgern durch entionisiertes Wasser. Parallel dazu wurden je 200 µl von Natrium Nitrit Lösung und von FFB Alkaline Lösung gemischt und für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 9 ml Aqua dest. und 200 µl Naphthol AS-BI Alkaline Lösung zugegeben und auf die Objektträger aufgetragen. Da die Färbelösung lichtempfindlich ist, erfolgte die 15 minütige Inkubation unter Lichtschutz. Darauf folgte die Gegenfärbung mit Neutral Rot Lösung, das sorgfältige Spülen mit Wasser und die wässrige Eindeckelung mit Karion. Aufgrund der wässrigen Eindeckelung mussten am darauf folgenden Tag die Deckgläser mit DePex oder Nagellack versiegelt werden.

### Immunhistochemie (Kollagen I,II)

- Rehydrieren der Schnitte in einer Küvette mit Waschpuffer für 10 Minuten
- Blockieren der endogenen Peroxidasen mit 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), 10% Methanol, 80% PBS 1x für 30 Minuten
- Spülen der Schnitte mit Waschpuffer, luftblasenfreies Einspannen in den Halter und Kontrolle der Dichtigkeit der Kammer
- Andau der Schnitte mit jeweils ca. 150 µl Pepsin 1mg/ml für 15 Minuten
- 3 x mit Waschpuffer waschen
- Zugabe von ca. 150 µl Blockingpuffer je Objektträger für 60 Minuten
- Inkubation mit dem in Blockingpuffer gelösten primären Antikörper gegen Kollagen-I oder -II über Nacht
- Nach Ablauf der Inkubationszeit 3 x mit Waschpuffer waschen
- Inkubation mit dem ebenfalls in Blockingpuffer gelösten Sekundärantikörper Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti-mouse für 60 Minuten und anschließend erneutes 3maliges waschen
- 30 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit muss die ABC-Lösung hergestellt werden, da diese selbst 30 Minuten inkubieren muss
- nach Zugabe der ABC-Lösung erneute Inkubation für 90 Minuten und danach

- sammeln der Schnitte in Waschpuffer
- Entwicklung der Färbung mit DAB, spülen der Schnitte entionisiertem Wasser
- Dehydrierung mit aufsteigender Propanolreihe und Xylol, abschließend eindeckeln mit DePex

### **2.2.11.2 Verdau für Kollagen II-Elisa**

Für die quantitative Analyse des Kollagen II-Gehalts wurden Elisas durchgeführt, wofür von jeder Probe 4 Stammzellaggregate verwendet wurden.

Zu diesen 4 Aggregaten wurden in einem ersten Schritt 200 µl Verdau NaCl/Essigsäure und 25 µl Essigsäure/Pepsin (10mg/ml Pepsin in 0,05M Essigsäure) gegeben. Nach einspannen in den Rotator und Andau über Nacht bei 4°C wurden die Cups kurz anzentrifugiert und anschließend mit dem PowerGen zerkleinert. Der Zerkleinerungseinsatz des PowerGen wurde nach jeder Probe mit 200 µl der Verdau NaCl/Essigsäure nachgespült um an diesem verbliebene Probenreste nicht zu verlieren.

Zu dieser Suspension wurden erneut 25 µl der Essigsäure/Pepsin-Lösung gegeben und sie wurde für weitere 48h unter ständiger Rotation bei 4°C verdaut. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 50 µl 10x TBS zugegeben und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Nachdem 50 µl Elastase (1mg/ml in 1x TBS) zugegeben waren, erfolgte eine erneute 24 stündige Inkubation bei 4°C unter Rotation.

Die Proben wurden daraufhin für 5 Minuten mit 10.000U/Min abzentrifugiert und der Überstand für die weitere Analytik (Kollagen II-Elisa, DNA-Bestimmung) gemäß dem jeweiligen Protokoll verwendet.

### **2.2.11.3 Scoring**

Zur standardisierten Beurteilung von Meniskusreparaturgewebe wurde am Lehrstuhl für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg ein Scoringssystem sowohl für die makroskopische Auswertung der gewonnenen Menisken als auch deren Histologie entwickelt und veröffentlicht [164].

Dieses System ist folgendermaßen aufgebaut:

1. Makroskopische Defektfüllung:

0= keine Füllung	1= <25%	2= 25-75%	3= >75%
------------------	---------	-----------	---------

2. Oberfläche:

0= keine Oberfläche	1= Kompletriss	2= rau, zerklüftet	3= meniskoider Schichtaufbau
---------------------	----------------	--------------------	------------------------------

3. Integration:

0= keine Integration	1= partiellen, einseitige Integration	2= beidseits partielle bzw. einseitig komplette Integration	3= komplette distale und proximale Integration
----------------------	---------------------------------------	---	--

4. Zellzahl:

0= keine Zellen	1= >10 Zellcluster/Schnitt	2= <10 Zellcluster/Schnitt Zell/Matrixverhältnis >0,5	3= meniskus-ähnliches Verhältnis
-----------------	----------------------------	--	----------------------------------

5. Zellverteilung/-morphologie

0= keine meniskoiden Zellen, Fibroblasten	1= <25% meniskoide Zellen	2= 25-75% meniskoide Zellen	3= >75% meniskoide Zellen
---	---------------------------	-----------------------------	---------------------------

6. Proteoglykangehalt:

0= keine Färbung	1= <25%	2= 25-75%	3= >75%
------------------	---------	-----------	---------

7. Kollagen Typ II-Gehalt:

0= kein Kollagen II	1= <25%	2= 25-75%	3= >75%
---------------------	---------	-----------	---------

8. Stabilität:

0= keine Stabilität	1= weich, gerissen	2= formstabil	3= druck- und zugelastisch
---------------------	--------------------	---------------	----------------------------

Summiert man die Einzelwerte zu einem Gesamtscore, so erhält man Gesamtwerte zwischen 0 (kein Reparaturgewebe) und 24 (meniskustypisches Gewebe).

### **2.2.12 Statistik**

Die statistische Auswertung der Scoringergebnisse erfolgte durch Errechnen der Gesamtsummen der einzelnen Scoringpunkte für jeden einzelnen Meniskus sowie durch das Bilden eines Mittelwertes von allen Menisken für jede behandelte Gruppe sowie die jeweils dazugehörigen Kontrollgruppen. Anschließend wurde jede behandelte Gruppe mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit PASW, die graphische Darstellung mit Microsoft Excel.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Ergebnisse des Serumtests**

Da unter Verwendung des für humane mesenchymale Stammzellen ausgetesteten FBS keine ausreichende Differenzierung von mensenchymalen Kaninchenstammzellen unter 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 erreicht werden konnte (siehe Abb. 3.1), musste für diese Zellen ein eigenes Serum ausgetestet werden. Die Stammzellen zeigten bereits während der Kultivierung in Zellkulturflaschen eine deutlich unterschiedliche und serumabhängige Wachstumsgeschwindigkeit. Bei einigen Testseren konnte überhaupt keine Konfluenz erreicht werden, so dass diese Seren bereits vor der Differenzierungsphase ausgeschlossen werden mussten. Es zeigten sich allerdings auch große Unterschiede zwischen den verschiedenen Kaninchen, von denen die Zellen gewonnen wurden. Die gut gewachsenen Zellen gingen in die Differenzierungsphase unter TGF- $\beta$ 1. In dieser Zeit schieden weitere Seren aus, da sich die Aggregate trotz gutem Wachstums der Zellen in der Anzuchtpause zunehmend auflösten und verschwanden. Nach der histologischen Auswertung der übrig gebliebenen Aggregate konnte letztlich ein Serum gefunden werden, das bei den meisten Kaninchenzellen eine relativ gute Differenzierung zeigte.

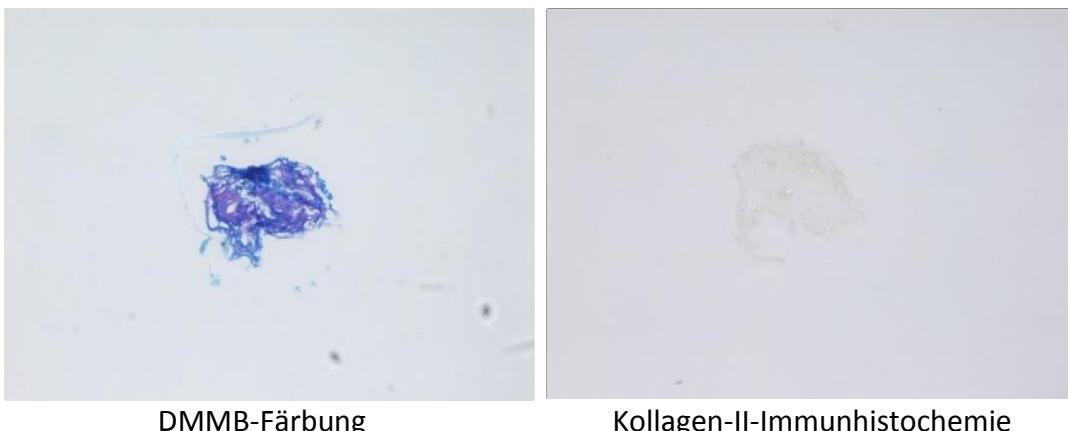


Abbildung 3.1: Histologische Ansicht eines Zellaggregates nach Differenzierung unter 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 21 Tage (Vergrößerung 10x)

### **3.2. FGF (Fibroblast Growth Factor) -Test**

Da die Differenzierung bei dem durchgeführten Serumtest (s.o.) auch mit dem am besten geeigneten FBS nicht durchwegs zufrieden stellend war, wurde ein Vergleich der chondrogenen Differenzierung mit und ohne Zugabe von Fibroblast Growth Factor (FGF) zum MSC-Medium durchgeführt. Bei allen Zellkulturflaschen mit FGF zeigte sich unabhängig vom verwendeten Serum und Kaninchen ein deutlich schnelleres Erreichen der Konfluenz als bei den jeweiligen Vergleichsflaschen ohne FGF. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz ebenfalls in die Differenzierungsphase in einer Aggregatkultur gegeben und anschließend histologisch ausgewertet. Bei dem Serum 250112 zeigte sich in allen Aggregaten eine gute chondogene Differenzierung, unabhängig davon, von welchem Kaninchen die Zellen stammten (siehe Abb.3.3) und auch unabhängig vom Zusatz von FGF zum MSC-Medium (siehe Abb.3.4). Ohne die Zugabe von FGF konnte allerdings nur eine deutlich geringere Zellzahl erzielt, oder die Konfluenz gar nicht erreicht werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche mit mesenchymalen Stammzellen von Neuseelandkaninchen das FBS 250112 mit Zusatz von FGF verwendet.

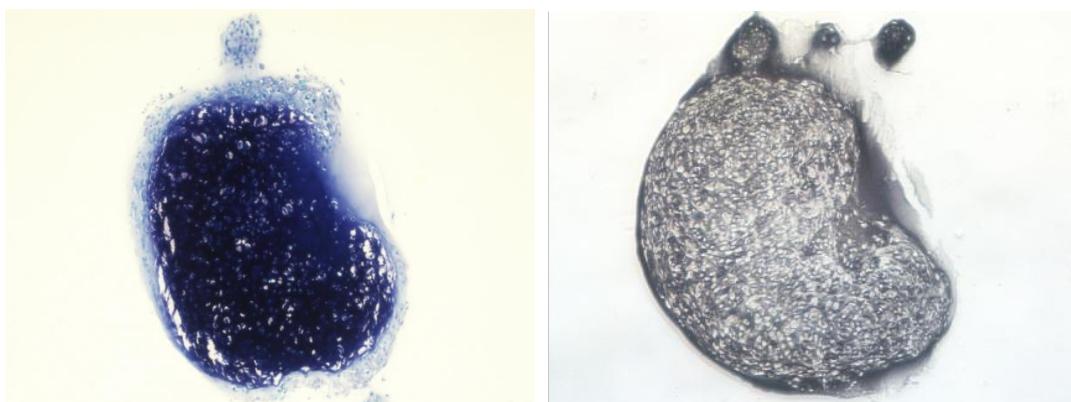


Abbildung 3.3: Histologische Ansicht eines Zellaggregates nach Differenzierung unter 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 21 Tage und Zellkultivierung mit FBS 250112 + FGF (Vergrößerung 4x)

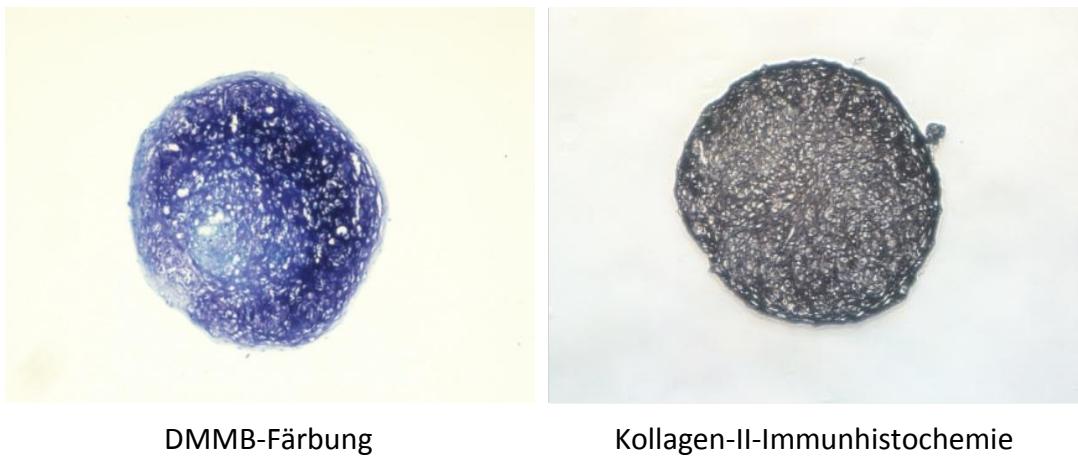


Abbildung 3.4 Histologische Ansicht eines Zellaggregates nach Differenzierung unter 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 21 Tage und Zellkultivierung mit FBS 250112 ohne FGF (Vergrößerung 4x)

### 3.3. Chondogene Differenzierung von passagierten mesenchymalen Neuseeland-kaninchenstammzellen

Da die Zahl an mesenchymalen Stammzellen von Kaninchen, die durch eine Knochenmarkpunktion gewonnen werden können, sehr beschränkt ist, wurde getestet, inwieweit die chondogene Differenzierungsfähigkeit der Zellen nach ein- und zweimaliger Passage erhalten bleibt, da hierdurch die zur Verfügung stehende Zellzahl vervielfacht werden könnte. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter Zugabe von FGF zum Zellkulturmedium. Hierbei zeigte sich nach chondriger Differenzierung in der Aggregatkultur unter 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 21 Tage sowohl für die Stammzellen der ersten, als auch die der zweiten Passage immunhistochemisch eine, verglichen mit den nativen Zellen, unverändert gute Expression von Kollagen II. Auch in der Glykosaminoglykanexpression konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Passagen festgestellt werden. Folglich wurde davon ausgegangen, dass gegebenenfalls eine Passagierung der mesenchymalen Stammzellen ohne Verlust der Differenzierungsfähigkeit möglich ist.

### **3.4. Dosiswirkungskurve für BMP-7 bei humanen MSCs**

Für die weiteren *in vitro*-Versuche war die Kenntnis der für die chondrogene Differenzierung idealen BMP-7 Konzentration essentiell. Deshalb wurde eine Dosiswirkungskurve für BMP-7 im chondrogenen Differenzierungsmedium durchgeführt und mittels Histologie und Kollagen-II-Elisa ausgewertet. Die einzelnen Konzentrationen des Wachstumsfaktors wurden sowohl mit als auch ohne 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 getestet (siehe Abb.3.5).

TGF- $\beta$ 10 ng/ml	ohne TGF- $\beta$
BMP-7 0 ng/ml	BMP-7 0 ng/ml
BMP-7 5 ng/ml	BMP-7 5 ng/ml
BMP-7 10 ng/ml	BMP-7 10 ng/ml
BMP-7 50 ng/ml	BMP-7 50 ng/ml
BMP-7 100 ng/ml	BMP-7 100 ng/ml
BMP-7 200 ng/ml	BMP-7 200 ng/ml

Abbildung 3.5: Gruppeneinteilung der Dosiswirkungskurve

In der histologischen Auswertung der Zellaggregate zeigte sich eine starke Expression von Glykosaminoglykanen sowie von Kollagen II in allen Gruppen mit TGF- $\beta$ 1, ohne dass eine deutliche Verbesserung durch die Zugabe von BMP-7 sichtbar war (siehe Abb. 3.6). In den Gruppen ohne TGF- $\beta$ 1 konnte histologisch keine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.7).

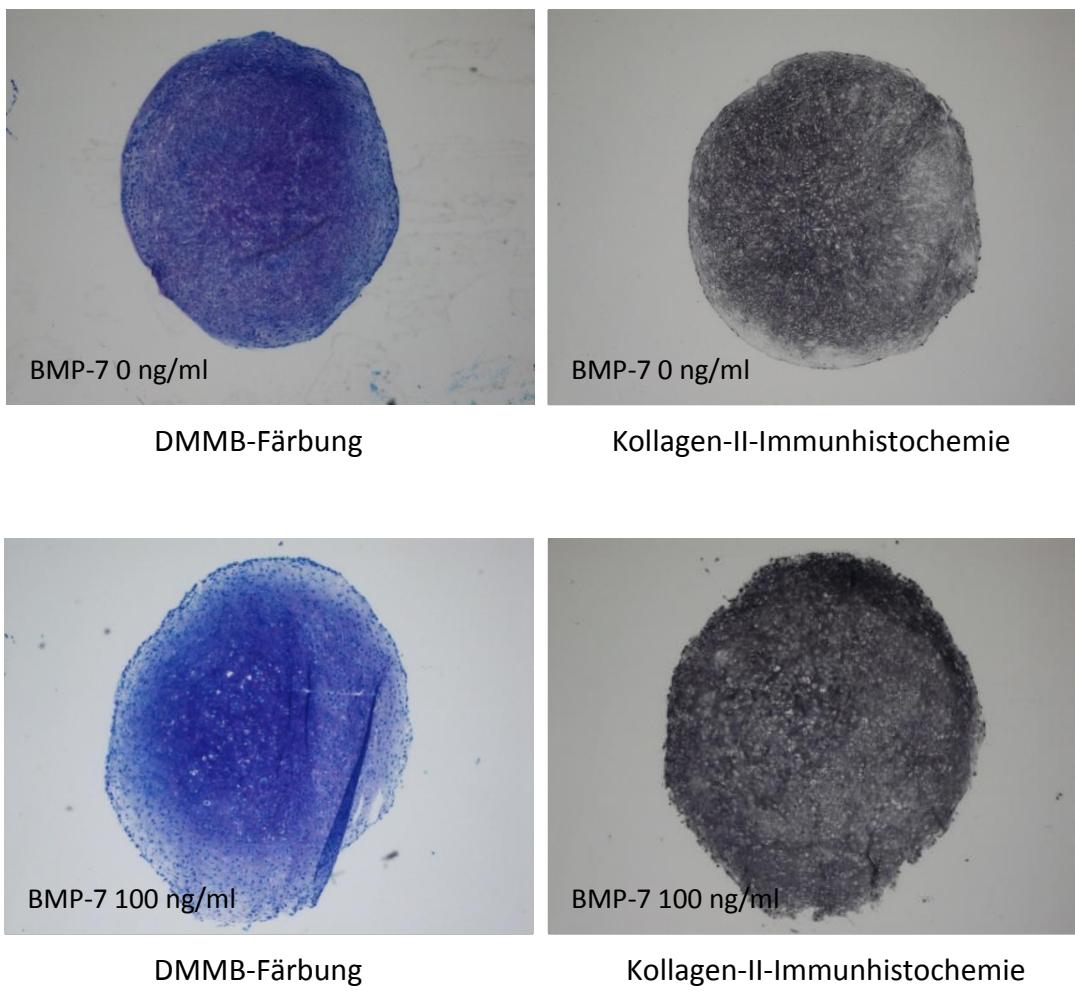


Abbildung 3.6: Histologische Ansicht von Zellaggregaten (Kollagen II

Immunochemical staining) bei Zugabe von TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml (Vergrößerung 4x)

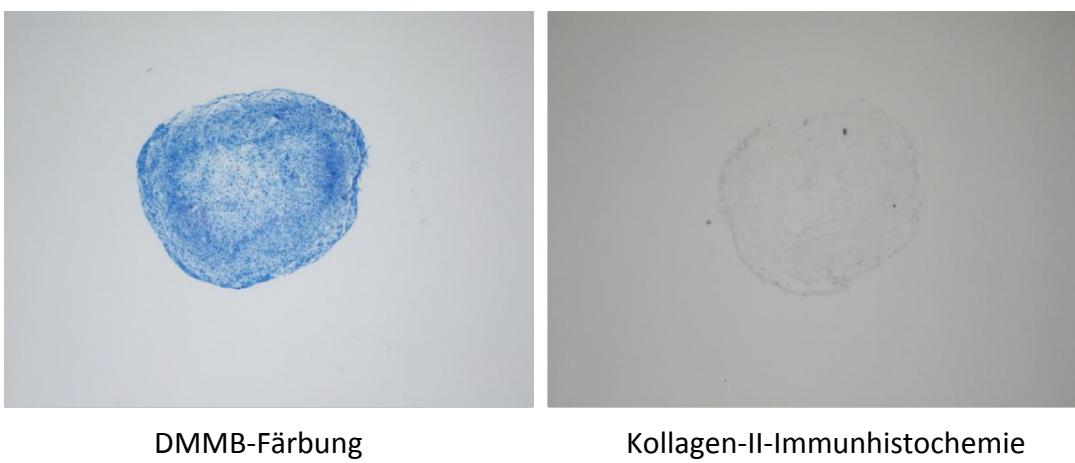


Abbildung 3.7: Histologische Ansicht eines Zellaggregates nach 21 Tagen

Differenzierung unter 100 ng/ml BMP-7 ohne TGF- $\beta$ 1 (Vergrößerung 4x)

Des Weiteren wurden die einzelnen Gruppen der Dosiswirkungskurve auch quantitativ mittels Kollagen II-Elisa untersucht. Hierbei zeigte sich ein, in der Histologie nicht erkennbarer, deutlicher Anstieg der Kollagen II-Konzentration bezogen auf die jeweilige DNA-Konzentration und damit die Zellzahl mit zunehmender Konzentration von BMP-7. Durch die zusätzliche Gabe von mindestens 50 ng/ml BMP-7 konnte nahezu eine Verdopplung der Kollagen II-Konzentration, verglichen mit der alleinigen Gabe von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1, erzielt werden. Dieser Anstieg war aber nicht signifikant. Durch eine noch höhere Konzentration des Differenzierungsfaktors (200 ng/ml) wurde eine weitere, allerdings nicht mehr so deutliche Steigerung erreicht (siehe Abb. 3.8). Eine deutlich geringere Expression von Kollagen II als in allen anderen Versuchsgruppen fand sich bei Zugabe von 10 ng/ml BMP-7, was aber ebenfalls nicht das Signifikanzniveau erreichte. In den Gruppen ohne TGF- $\beta$ 1 war durchwegs wesentlich (um den Faktor 5-10) weniger Kollagen II messbar. Auch ein Anstieg durch Zugabe von BMP-7 in steigender Konzentration konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb.3.8).

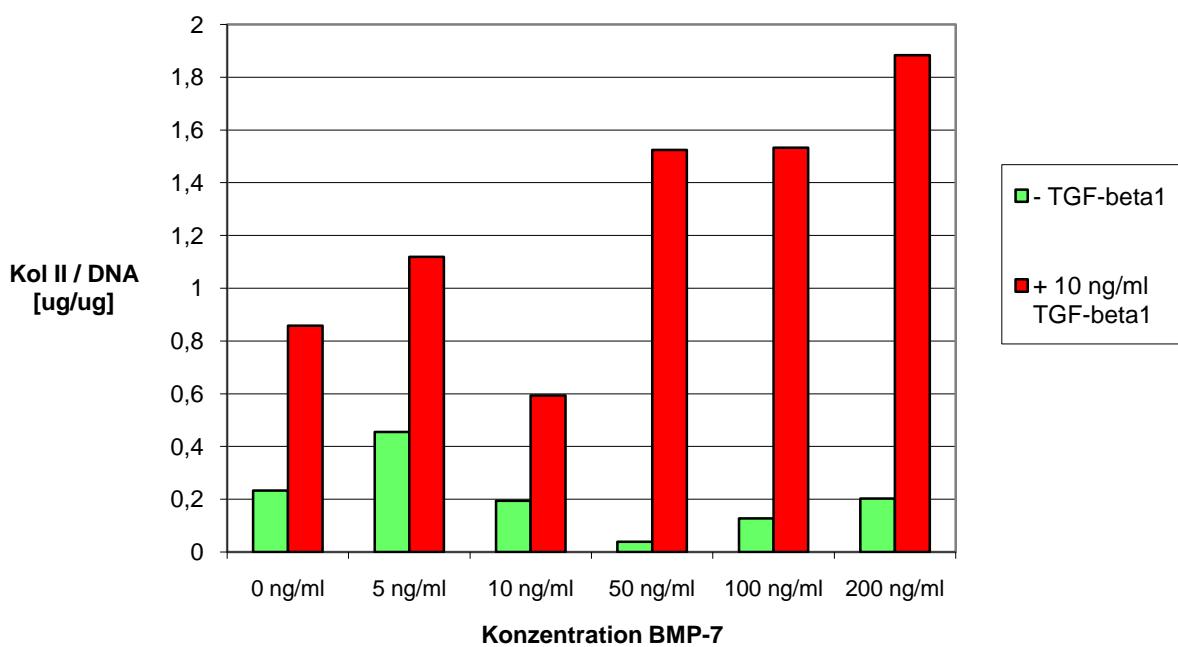


Abbildung 3.8: Kollagen II Elisa von Zellaggregaten nach 21 d Differenzierung unter Zugabe der beschriebenen Wachstumsfaktoren (Kollagen II Konzentration auf DNA-Konzentration bezogen) \*p<0,05

Um die Zellaggregate hinsichtlich einer möglichen Hypertrophie zu untersuchen, wurde eine Alkalische-Phosphatase-Färbung durchgeführt. In dieser konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender BMP-7-Konzentration im Differenzierungsmedium auch die Expression von alkalischer Phosphatase ansteigt. Bei der höchsten BMP-Konzentration war diese so stark ausgeprägt, dass die Konzentration trotz der höchsten Kollagen-II-Expression nicht für die weiteren Versuche in Frage kam (siehe Abb. 3.9). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche mit humanen mesenchymalen Stammzellen die Konzentration 100 ng/ml BMP-7 verwendet. Bei dieser Konzentration konnte alkalische Phosphatase nur im äußersten Randbereich nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.10).

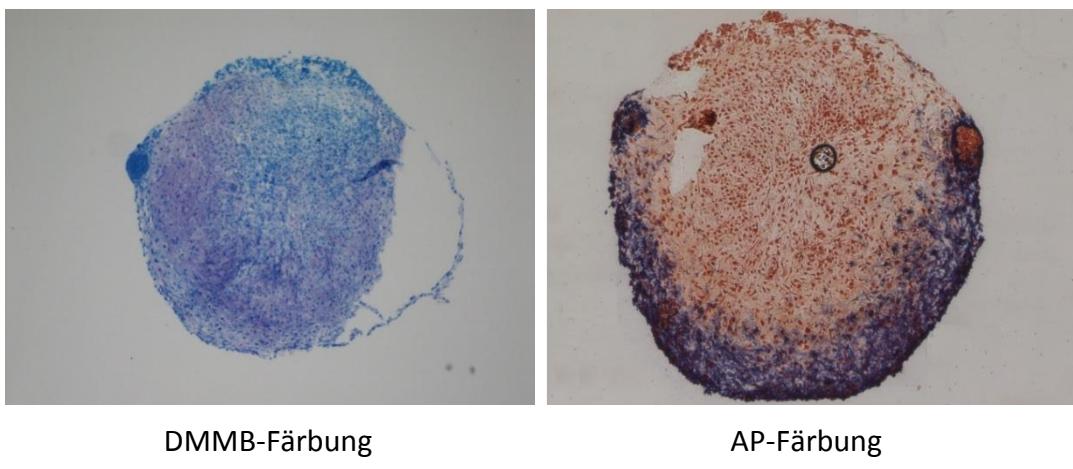


Abbildung 3.9 Histologische Ansicht eines Zellaggregates, 200ng/ml BMP-7, 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Vergrößerung 4x)

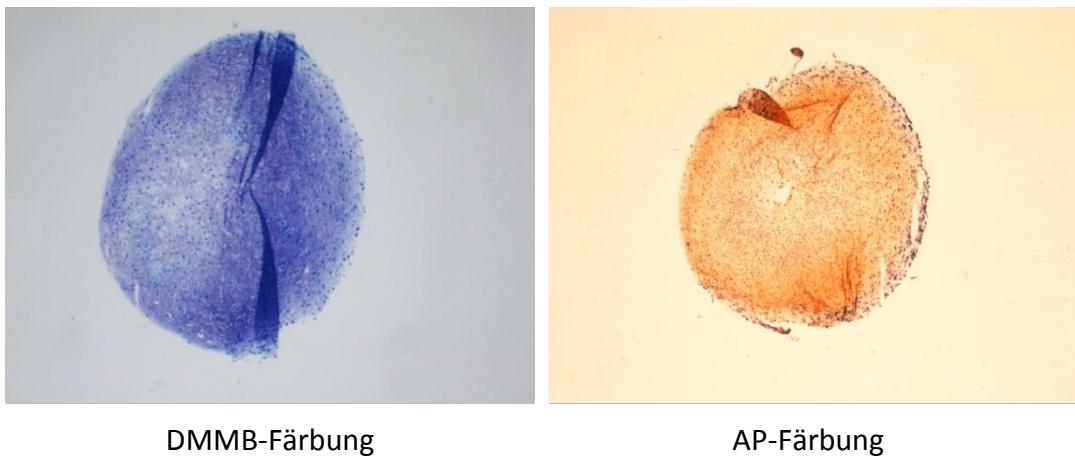


Abbildung 3.10 Histologische Ansicht eines Zellaggregates, 100 ng/ml BMP-7, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Vergrößerung 4x)

Nur unter dem Einfluss von BMP-7 im Differenzierungsmedium ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1 war für alle BMP-Konzentrationen nach 21 Tagen fast keine alkalische Phosphatase nachweisbar (siehe Abb. 3.11).

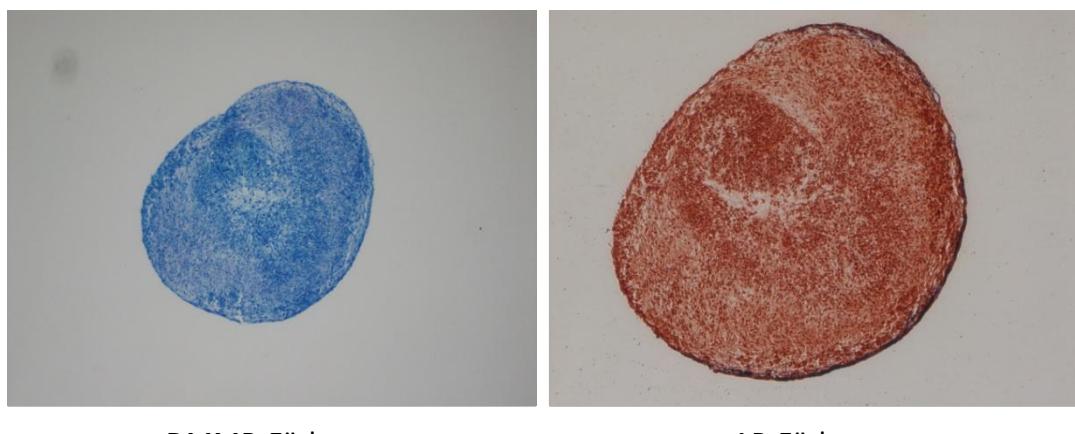


Abbildung 3.11 Histologische Ansicht von Zellaggregaten zweier Patienten (Alkalische Phosphatase-Färbung), 200 ng/ml BMP-7 (Vergrößerung 4x)

### **3.5 Dosiswirkungskurve bei mesenchymalen Kaninchenstammzellen**

Analog zum Versuchsaufbau der Dosiswirkungskurve bei humanen mesenchymalen Stammzellen wurde der Versuch mit Kaninchenstammzellen durchgeführt, um die optimale Konzentration an BMP-7 für die Vorkultivierung der Stammzellen in chondrogenem Kulturmedium bei der entsprechenden Gruppe des *in vivo*-Versuchs zu finden. Auch hier erfolgte die Auswertung mittels Histologie und Kollagen-II-Elisa.

Makroskopisch zeigt sich in allen Aggregatgruppen, die TGF- $\beta$ 1 in der Dosierung 10 ng/ml erhalten haben, unabhängig von der BMP-7-Dosierung, ein relativ uniformes Erscheinungsbild. Die Aggregate, die kein TGF- $\beta$ 1 im Differenzierungsmedium erhalten haben, waren deutlich kleiner und zeigten mit zunehmender BMP-7-Konzentration eine deutliche Größenzunahme (siehe Abb. 3.12). In der Gruppe ohne BMP-7 und ohne TGF- $\beta$ 1 löste sich bei einer der verwendeten Zellreihen 1 Aggregat, bei den beiden anderen Zellreihen 2 der je 7 Aggregate über die Differenzierungszeit von 21 Tagen komplett auf.

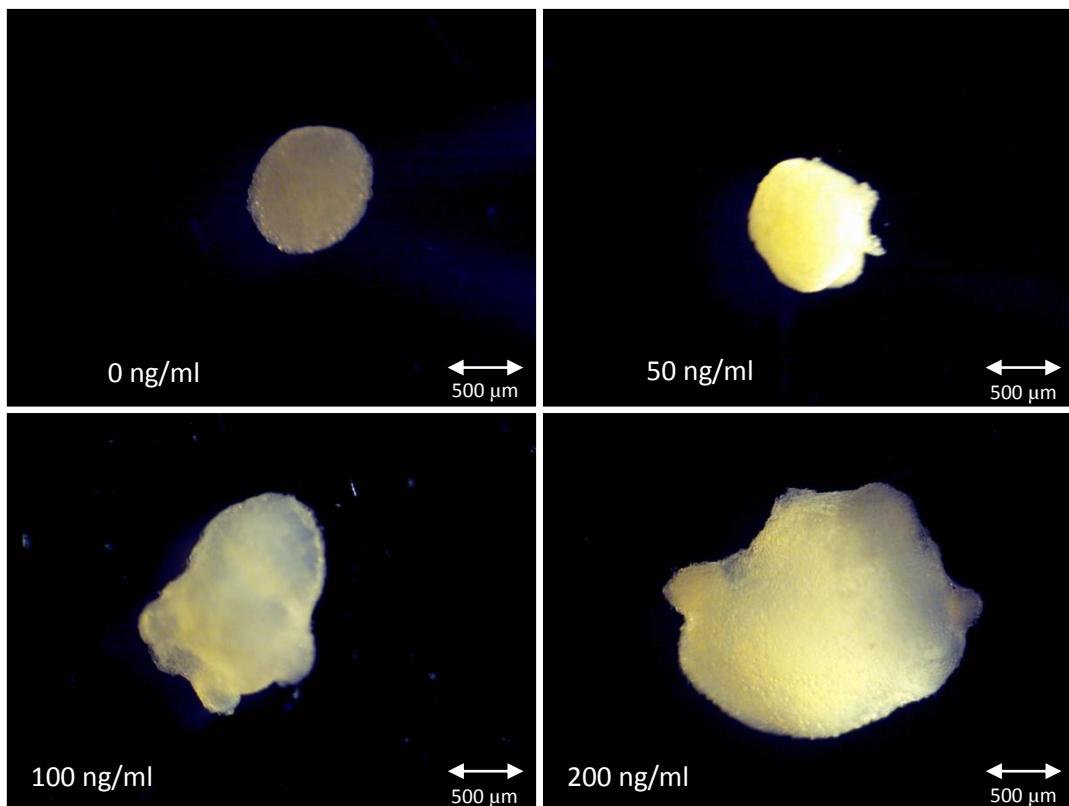


Abbildung 3.12 Makroskopische Bilder von Zellaggregaten einer Zelllinie nach 21 Tagen Differenzierung unter Zugabe der genannten Konzentration an BMP-7 ohne TGF- $\beta$

Histologisch zeigten alle Gruppen mit TGF- $\beta$ 1 nach 21 Tagen Differenzierung in der DMMB-Färbung eine gleichmäßige, starke Glykosaminoglykanexpression, ebenfalls unabhängig von der BMP-7-Konzentration. Analog dazu war immunhistochemisch in allen Gruppen eine gleichmäßig starke Expression von Kollagen-II nachweisbar (siehe Abb. 3.13). Ohne TGF- $\beta$ 1 ist sowohl die Glykosaminoglykan-, als auch die Kollagen-II-Expression deutlich schwächer und ungleichmäßiger ausgeprägt. Allerdings wird sie bei hohen BMP-7-Konzentrationen auch deutlich stärker als bei niedrigen Konzentrationen (siehe Abb. 3.14).

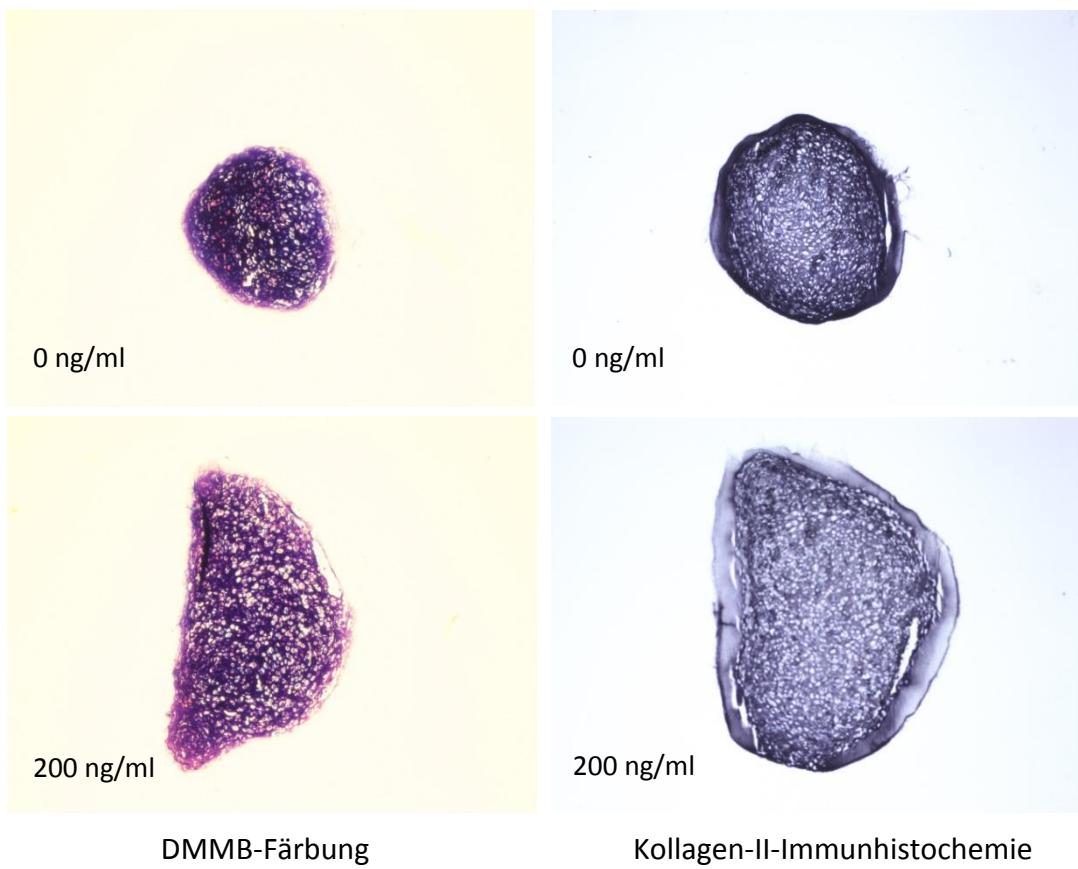


Abbildung 3.13 Histologische Ansicht von Zellaggregaten einer Zellreihe nach 21 Tagen  
Differenzierung unter genannter Konzentration an BMP-7 und 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1  
(Vergrößerung 4x)

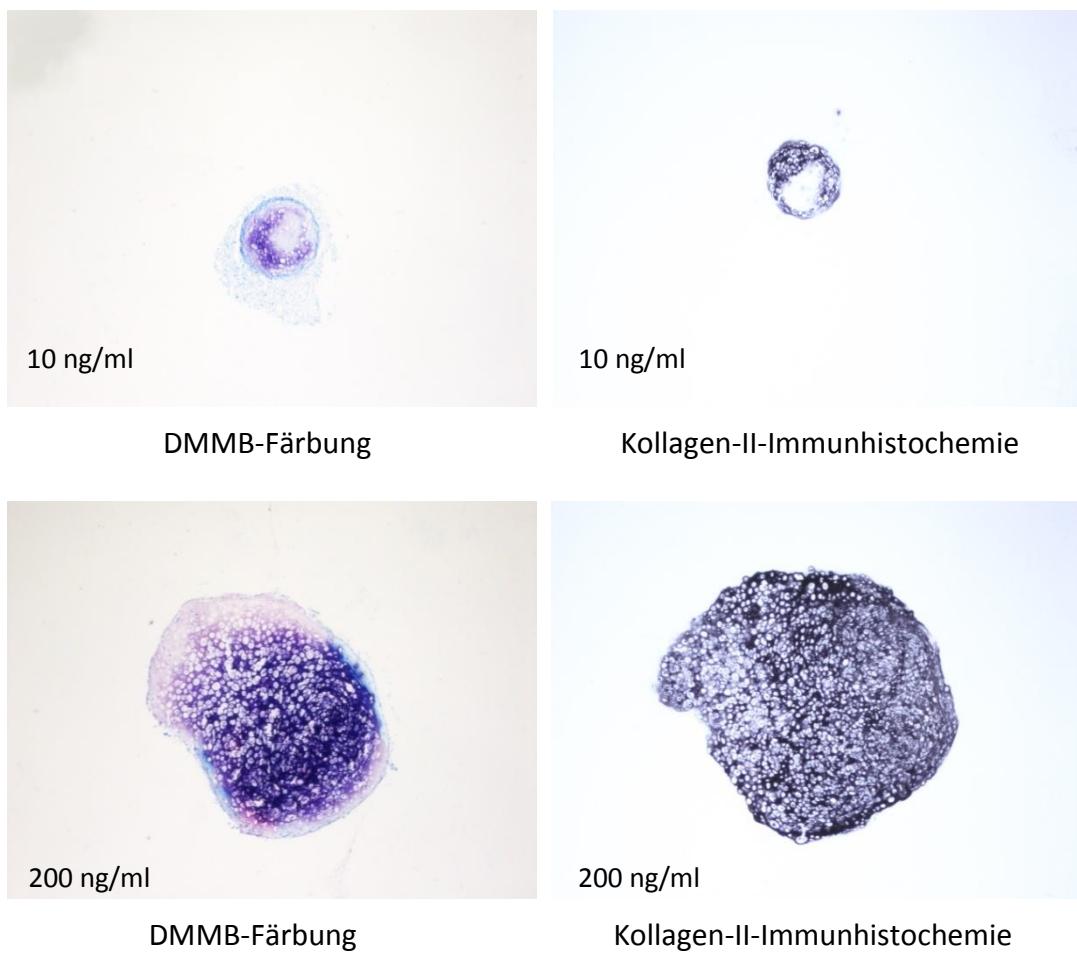


Abbildung 3.14 Histologische Ansicht von Zellaggregaten einer Zellreihe nach 21 Tagen Differenzierung unter genannter Konzentration an BMP-7 ohne TGF- $\beta$ 1 (Vergrößerung 4x)

Es lässt sich bereits in den an Tag-1 entnommenen Aggregaten immunhistochemisch eine leichte Kollagen-I-Expression nachweisen. Sowohl in den Gruppen mit als auch in den Gruppen ohne TGF- $\beta$ 1 zeigt sich in den Randbereichen der Aggregate mit steigender BMP-7-Konzentration zunehmend Kollagen-I.

Die histologischen Schnitte wurden ebenfalls auf alkalische Phosphatase gefärbt. Hier zeigte sich in allen Gruppen, die den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 erhalten haben, eine

mehr oder weniger deutlich ausgeprägte, sich diffus über das gesamte Aggregat verteilende Expression von alkalischer Phosphatase. Sie ist bereits bei alleiniger Zugabe von TGF- $\beta$ 1 als Differenzierungsfaktor nachweisbar und steigt mit zunehmender BMP-7-Konzentration weiter an (siehe Abb. 3.17). In den Aggregatgruppen, welche kein TGF- $\beta$ 1 im Differenzierungsmedium erhielten, ist nur eine deutlich geringere Aktivität von alkalischer Phosphatase nachweisbar. Mit zunehmender Konzentration an BMP-7 steigt sie allerdings auch in diesem Fall an. In der Kontrollgruppe, deren Differenzierungsmedium weder TGF- $\beta$ 1, noch BMP-7 enthielt, konnte keine Aktivität von alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden.

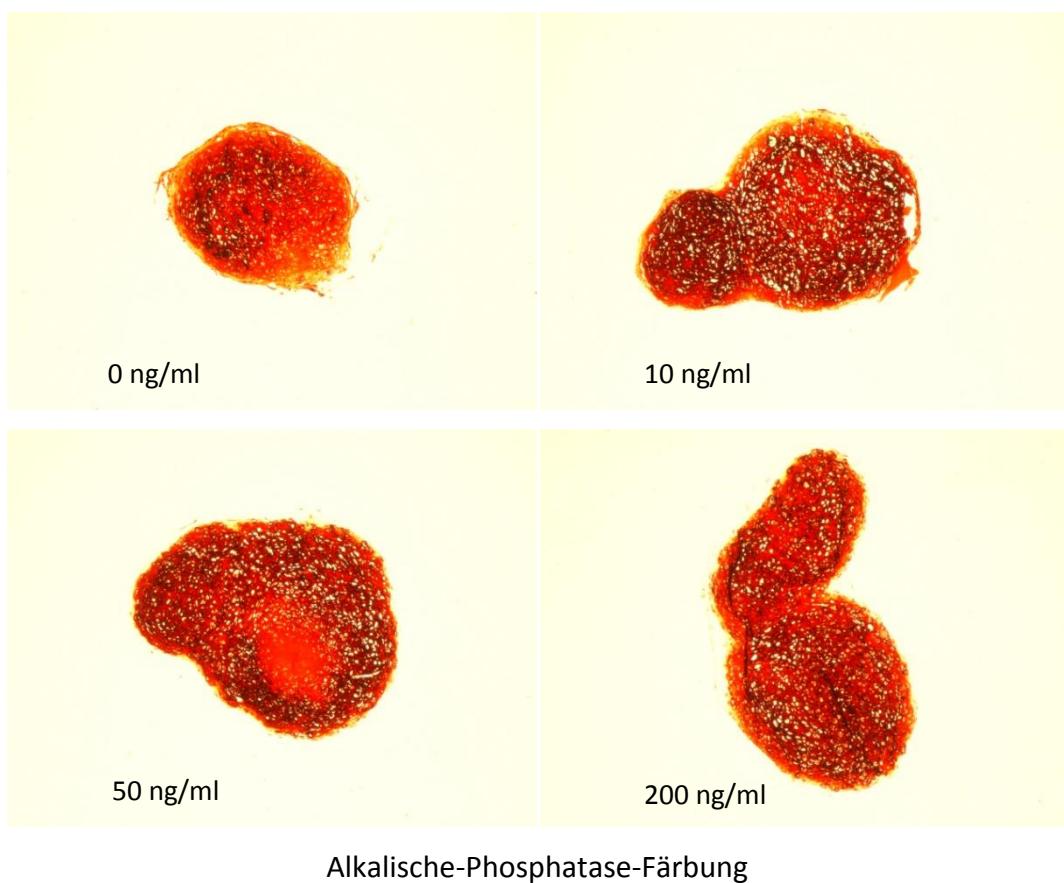


Abbildung 3.17 Histologische Ansicht von Zellaggregaten einer Zellreihe nach 21 Tagen Differenzierung unter genannter Konzentration an BMP-7 und 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1  
(Vergrößerung 4x)

Die quantitative Untersuchung des gebildeten Kollagen-II erfolgte durch einen Kollagen-II-Elisa. Hierbei zeigte sich in den Aggregatgruppen mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 mit steigender BMP-7-Konzentration keine deutliche Änderung der gebildeten Kollagen-II-Menge. Es konnte jedoch bei allen Zellreihen der höchste Wert an Kollagen-II bei der BMP-7-Konzentration 50ng/ml im Differenzierungsmedium beobachtet werden (siehe Abb. 3.18). Dies zeigte sich besonders deutlich bei der Betrachtung der Mittelwerte über die verschiedenen Zellreihen. Im Vergleich zu der nächst niedrigeren Konzentration von 10 ng/ml wurde signifikant mehr Kollagen-II gebildet ( $p=0,015$ ). Verglichen mit den beiden höheren Konzentrationen 100 ng/ml bzw. 200 ng/ml war der Unterschied nicht signifikant ( $p=0,15$  bzw.  $p=0,33$ ).

Bei Verzicht auf TGF- $\beta$ 1 im Differenzierungsmedium konnte mit zunehmender BMP-7-Konzentration ein Anstieg der gebildeten Kollagen-II-Menge gezeigt werden (siehe Abb. 3.18).

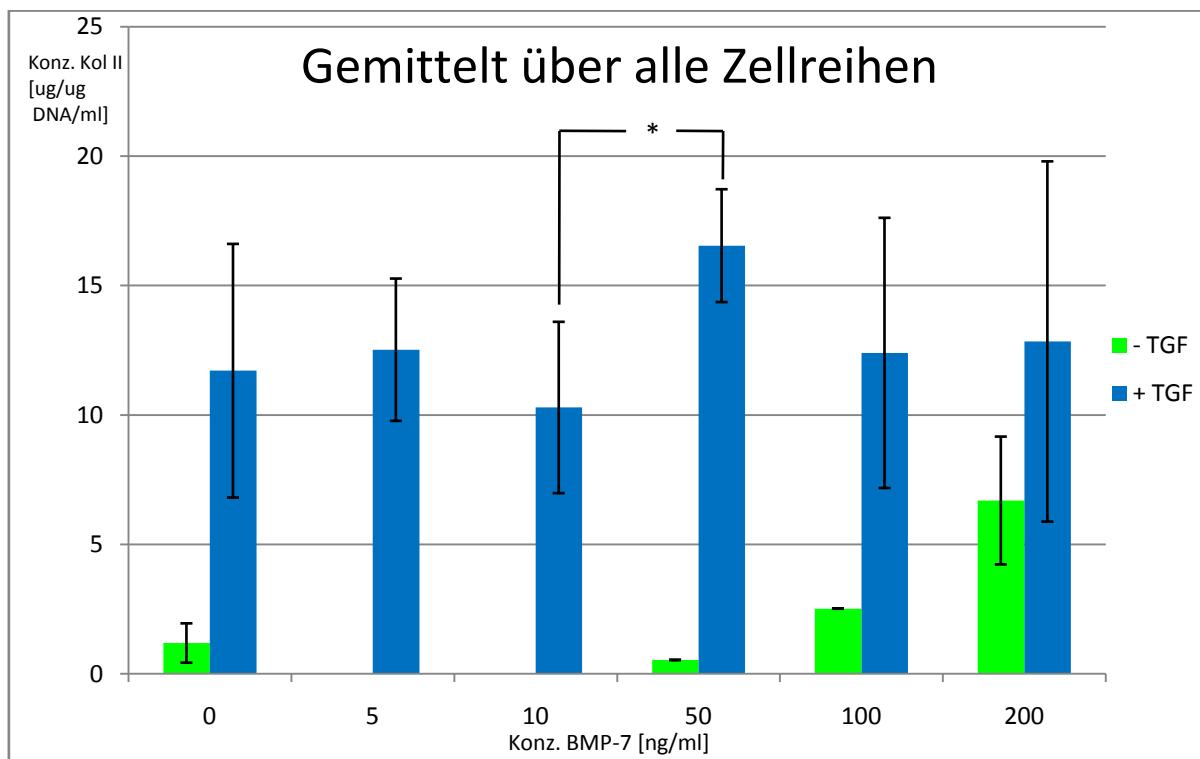


Abbildung 3.18 Mittelwerte der Kollagen II Elisas aller Kaninchen (Kollagen II Konzentration auf DNA-Konzentration bezogen) gemessen in den Aggregatkulturen nach 21 Tagen Differenzierung \* $p<0,05$

Bei der Messung der DNA-Menge zeigten sich in allen Gruppen, welche TGF- $\beta$ 1 erhielten, annähernd gleiche DNA-Konzentrationen in allen Gruppen, unabhängig von der BMP-7-Konzentration (siehe Abb. 3.19). Verglichen mit der ursprünglichen DNA-Menge an Tag 1 fielen die Werte allerdings etwas geringer aus. Signifikante Unterschiede in den DNA-Konzentrationen konnten zwischen den Gruppen, welche verschiedene Konzentrationen an BMP-7 erhalten haben, nicht festgestellt werden.

Bei alleinigem Differenzierungsfaktor BMP-7 im Medium zeigte sich eine Abhängigkeit der DNA-Menge von der BMP-7-Konzentration. Bei sehr geringen Konzentrationen im Differenzierungsmedium war nach 21 Tagen auch die DNA-Menge und folglich auch die Zahl an noch vitalen Zellen nur noch sehr gering, verglichen mit den Gruppen, welche eine höhere Konzentration des Wachstumsfaktors erhalten hatten (siehe Abb. 3.19).

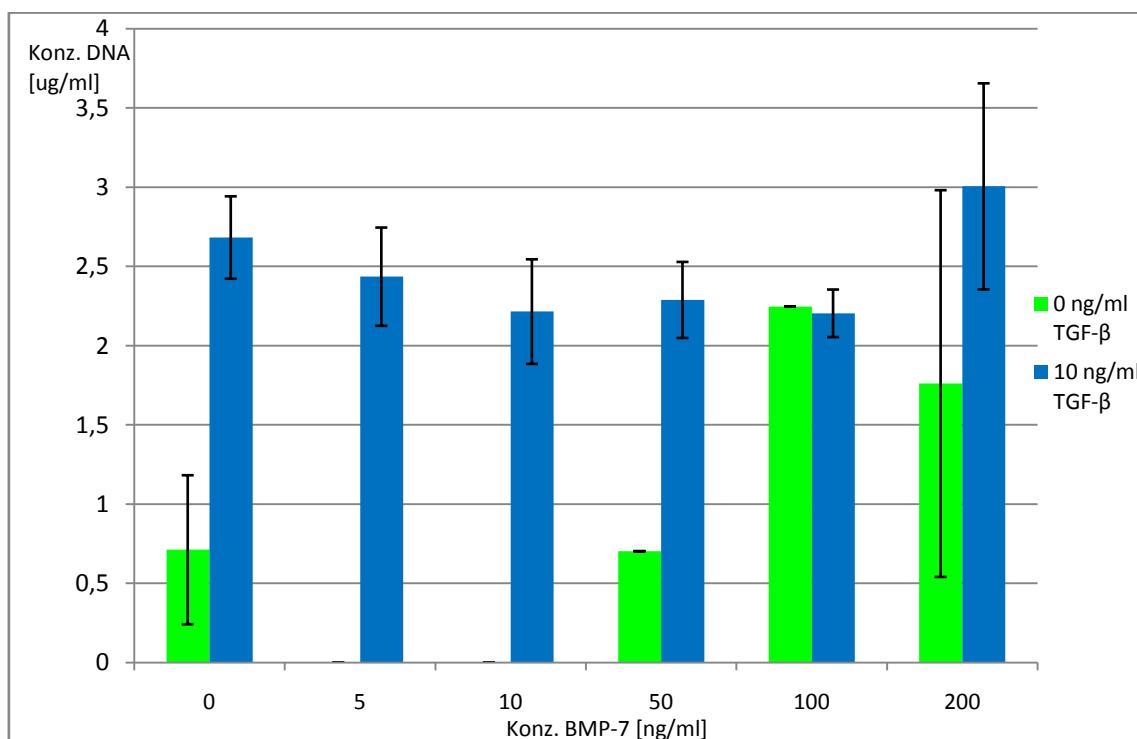


Abbildung 3.19 Mittelwerte der DNA-Konzentrationen aller Kaninchen gemessen in den Aggregatkulturen nach 21 Tagen Differenzierung

\*p<0,05

Aufgrund der Ergebnisse des Kollagen-II-Elisas und der Histologie wurde für die Vorkultivierung der Stammzellen für den *in vivo*-Versuchsteil die BMP-Konzentration 50 ng/ml in Kombination mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 gewählt, da durch sie die optimale chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Kaninchenstammzellen erreicht werden konnte, ohne dass dazu eine relevante osteogene Differenzierung in Kauf genommen werden musste.

### **3.6 Effekt von BMP-7 auf die chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Makroskopisch zeigte sich über die Kultivierungszeit eine deutliche Größenzunahme der Zellaggregate durch die alleinige Zugabe von 100 ng/ml BMP-7 oder 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Wachstumsfaktoren. Diese Größenzunahme ist in der TGF- $\beta$ 1-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt als in der Gruppe mit BMP-7. Auch mit zunehmender Kulturdauer wachsen die Zellaggregate. Durch den kombinierten Zusatz von BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 konnte ein additiver Effekt im Vergleich zur alleinigen Zugabe eines der Wachstumsfaktoren beobachtet werden (siehe Abb. 3.20). Dies war bei allen Zelllinien gleichermaßen der Fall.

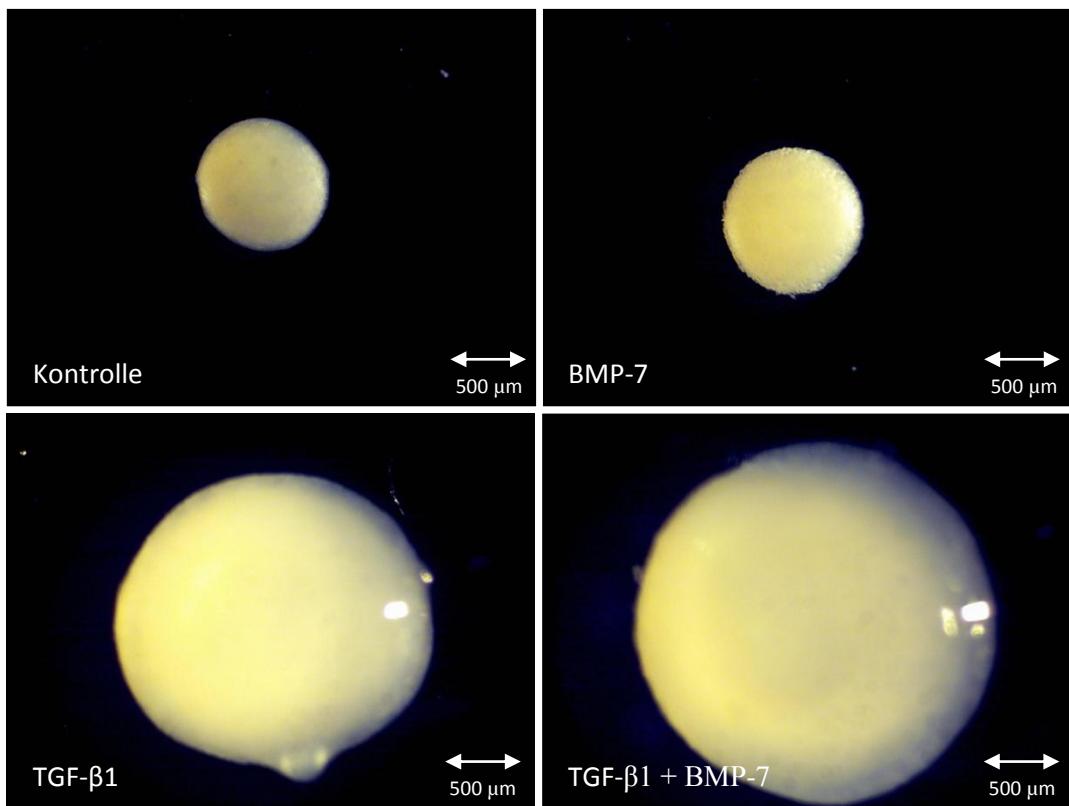


Abbildung 3.20 Makroskopische Bilder von Zellaggregaten einer Zelllinie nach 21 Tagen Kultivierung unter Zugabe der genannten Wachstumsfaktoren

Sowohl in der Glykosaminoglykanfärbung als auch immunhistochemisch zeigte sich eine über die Kultivierungszeit zunehmende Differenzierung sowohl in der Gruppe mit dem alleinigen Differenzierungsfaktor TGF- $\beta$ 1 als auch in der Gruppe mit TGF- $\beta$ 1 und BMP-7. Gut differenziert waren die Zellaggregate erst am Entnahmetag 21, wobei in den Gruppen mit TGF- $\beta$ 1 durch die zusätzliche Zugabe von BMP-7 histologisch allenfalls eine geringfügige Verbesserung der Differenzierung in den sehr gut durchdifferenzierten Aggregaten beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.21). Ohne TGF- $\beta$ 1 im Differenzierungsmedium waren allenfalls in sehr geringem Umfang Glykosaminoglykane oder Kollagen II nachweisbar. An den früheren Zeitpunkten Tag 7 und Tag 14 war sowohl die Glykosaminoglykan- als auch die Kollagen II-Expression sehr gering, allerdings war an Tag 14 bei den Zellaggregaten, welche zusätzlich zu TGF- $\beta$ 1 noch BMP-7 als Wachstumsfaktor erhalten hatten, eine bessere Differenzierung

nachweisbar als bei solchen, welche nur TGF- $\beta$ 1 erhalten hatten (siehe Abb. 3.22). Am Entnahmetag 1 war keine Differenzierung nachweisbar.

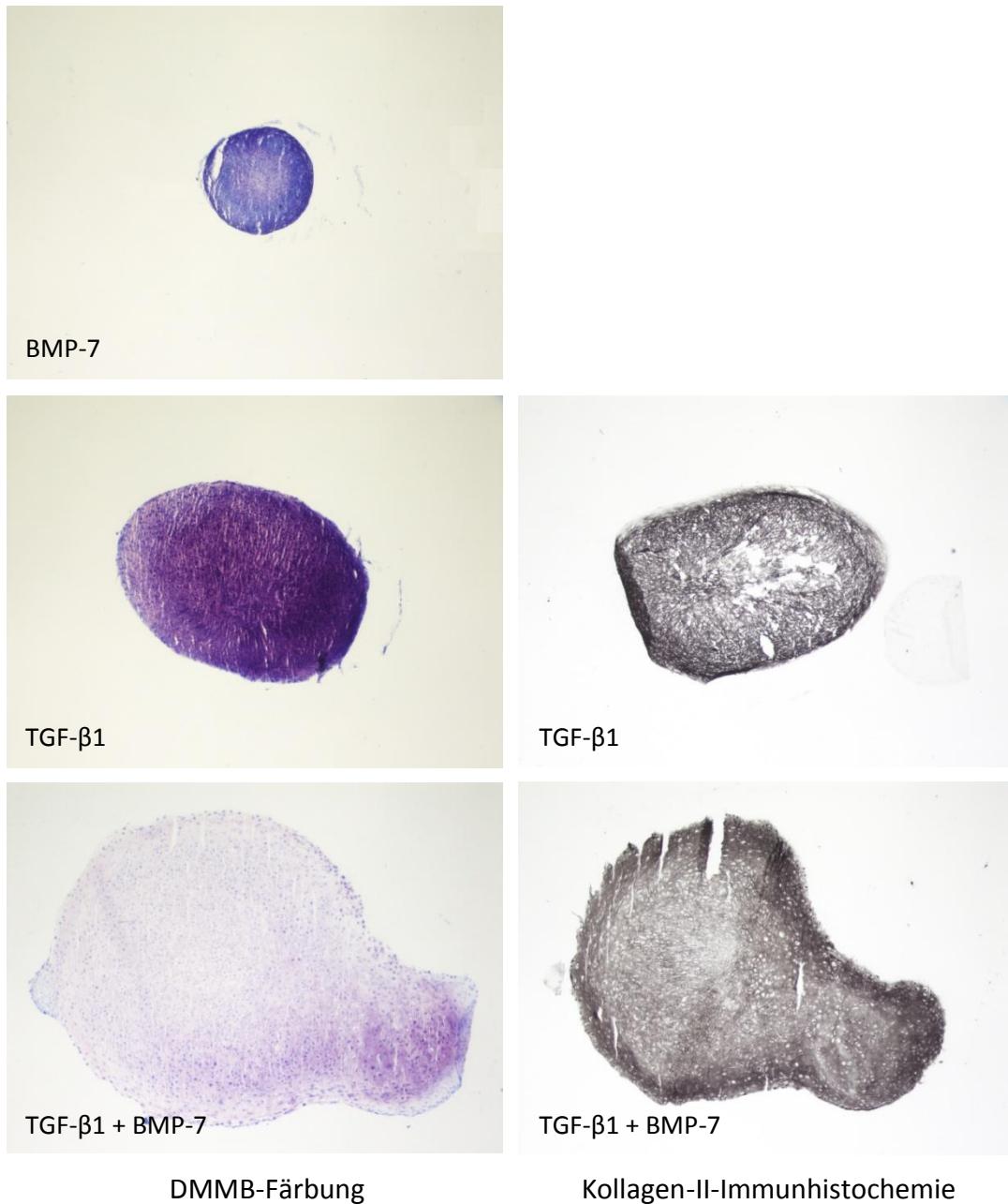


Abbildung 3.21 Histologische Ansicht von Zellaggregaten nach 21 Tagen  
Differenzierung unter den genannten Wachstumsfaktoren (Vergrößerung 4x)

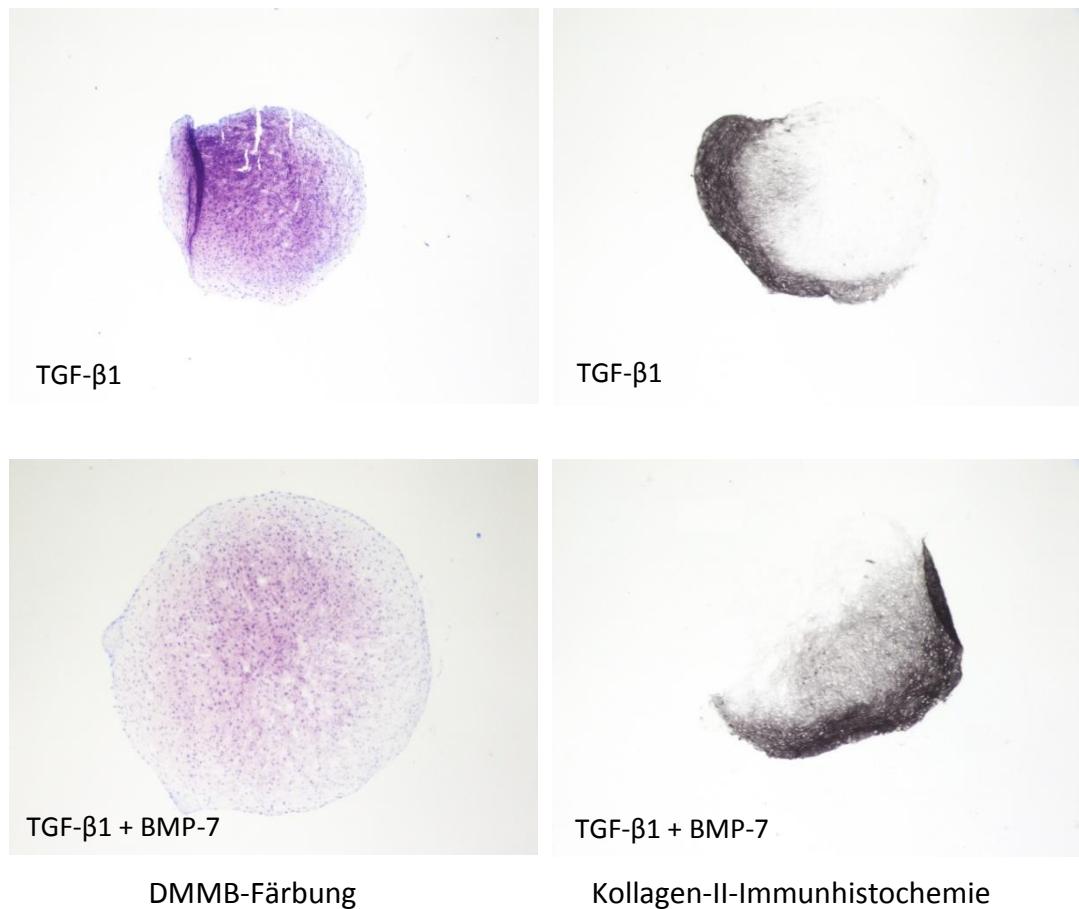


Abbildung 3.22 Histologische Ansicht von Zellaggregaten nach 14 Tagen Differenzierung unter genannten Wachstumsfaktoren (Vergrößerung 4x)

Bei der Färbung auf alkalische Phosphatase zeigte sich am Tag 1 und am Tag 7 keine Anfärbbarkeit. An Tag 14 konnte in den Gruppen mit TGF- $\beta$ 1 und BMP-7 bereits alkalische Phosphatase in den Randbereichen der Aggregate nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.24). In allen anderen Gruppen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Expression von alkalischer Phosphatase.

Nach 21 Tagen Kultur war in den Gruppen mit beiden Wachstumsfaktoren ein deutlich breiterer und intensiverer Randsaum mit alkalischer Phosphatase sichtbar. In deutlich geringerem Umfang war zu diesem Zeitpunkt auch in den Gruppen nur mit TGF- $\beta$ 1 bzw. nur mit BMP-7 in den Randbereichen der Aggregate eine Expression von

alkalischer Phosphatase nachweisbar (siehe Abb. 3.25). Es zeigte sich somit auch bezüglich der Hypertrophie der Zellen ein additiver Effekt durch die kombinierte Zugabe von BMP-7 und TGF- $\beta$ 1, welche bereits zu früheren Differenzierungszeitpunkten einzusetzen als bei Verwendung von lediglich einem Differenzierungsfaktor.

In den Kontrollgruppen ohne einen der beiden Faktoren war keinerlei Aktivität von alkalischer Phosphatase zu sehen.

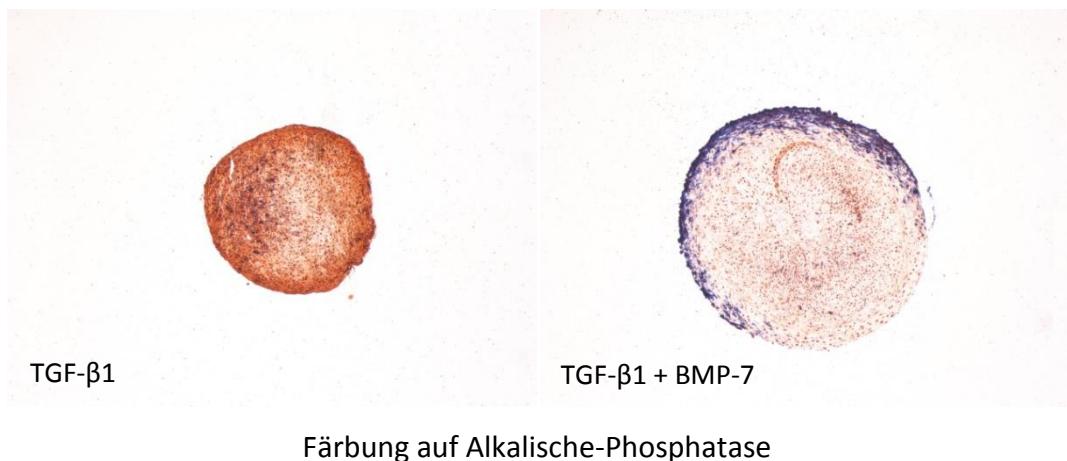


Abbildung 3.24 Histologische Ansicht von Zellaggregaten einer Zellreihe nach 14 Tagen Differenzierung unter den genannten Wachstumsfaktoren (Vergrößerung 4x)

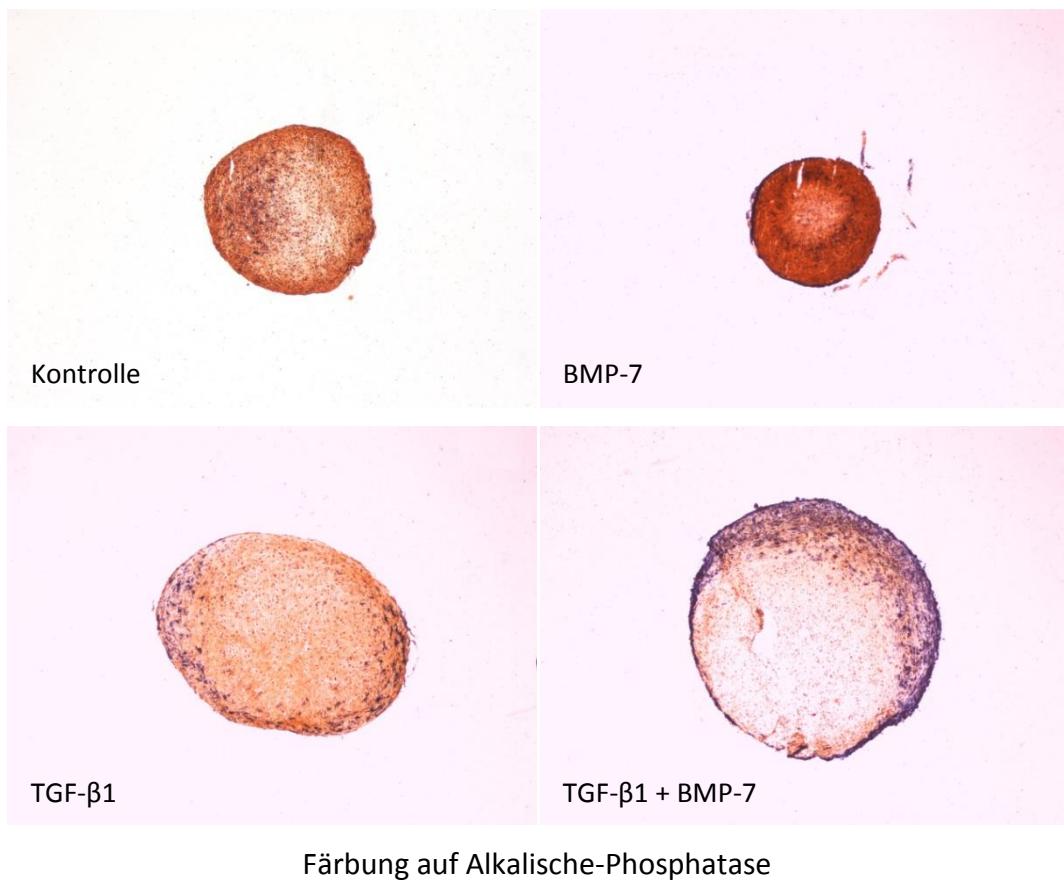


Abbildung 3.25 Histologische Ansicht von Zellaggregaten nach 21 Tagen  
Differenzierung unter den genannten Wachstumsfaktoren (Vergrößerung 4x)

In der quantitativen Auswertung mittels Kollagen II-Elisa zeigte sich, dass sowohl in der Kontrollgruppe ohne TGF- $\beta$ 1 und BMP-7 als auch in der Gruppe nur mit BMP-7 keine Kollagen II-Expression über die gesamte Laufzeit stattfindet. An Tag 1 ist ebenfalls kein Kollagen II nachweisbar.

Bereits an Tag 14 war in der Gruppe nur mit TGF- $\beta$ 1 Kollagen II messbar. Die Menge an Kollagen II, bezogen auf die gemessene DNA-Menge, konnte durch die zusätzliche Gabe von BMP-7 noch tendenziell gesteigert werden, allerdings war diese Steigerung nicht signifikant ( $p=0,208$ ). Nach 21 Tagen Kultivierung stieg die Gesamtmenge an Kollagen-II bezogen auf die DNA-Menge gegenüber Tag 14 nochmals deutlich an, auch zu diesem Zeitpunkt konnte eine Steigerung der Kollagen II-Menge durch die Zugabe

von BMP-7 erreicht werden. Die Steigerung der gebildeten Kollagen II-Menge durch die Zugabe von sowohl BMP-7 als auch TGF- $\beta$ 1 gegenüber der alleinigen Zugabe von TGF- $\beta$ 1 war nicht signifikant ( $p= 0,155$ ), ebenso die Steigerung von Tag 14 auf Tag 21 in den Gruppen mit TGF- $\beta$ 1 ohne bzw. mit BMP-7 ( $p=0,125$  bzw.  $p=0,094$ ) (siehe Abb. 3.26). Die erzielte Gesamtmenge an Kollagen II war allerdings zwischen den verschiedenen Zellreihen sehr unterschiedlich.

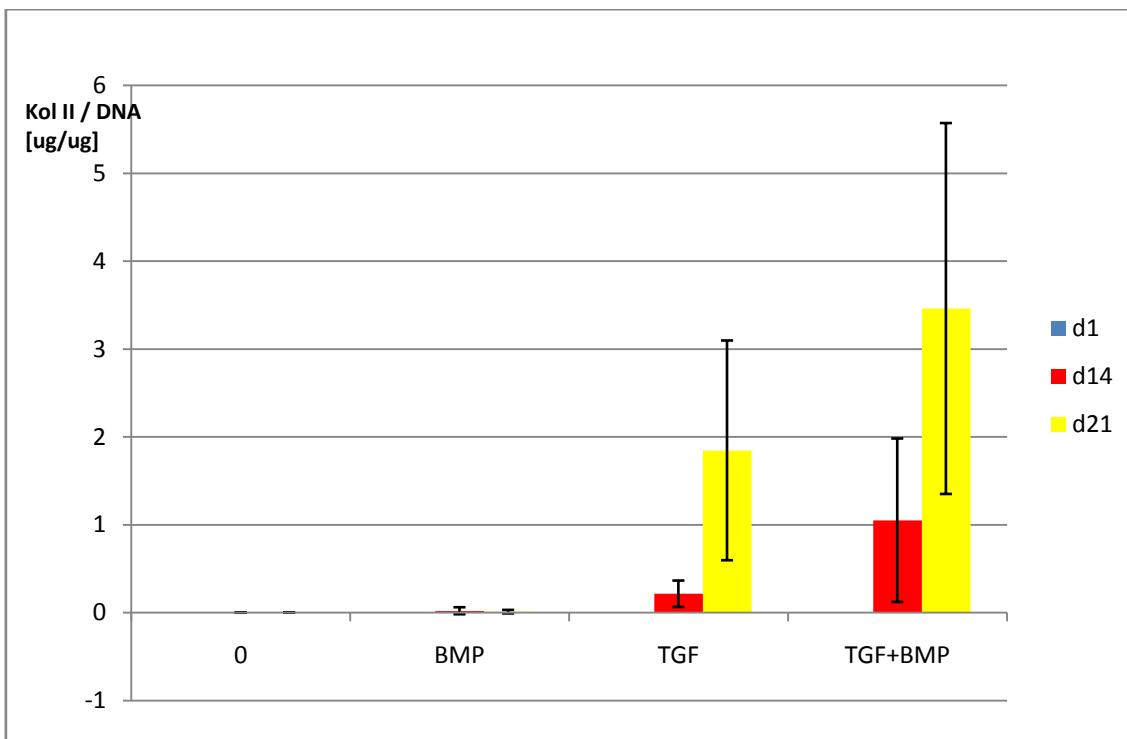


Abbildung 3.26 Kollagen II Elisa (Kollagen II Konzentration auf DNA-Konzentration

bezogen)

\* $p<0,05$

Bei der alleinigen Betrachtung der quantitativen Menge an Kollagen II, ohne diese auf die DNA-Menge zu beziehen, zeigte sich ein vergleichbares Bild. Das jeweilige Signifikanzniveau war ebenfalls nahezu identisch zu dem entsprechenden, auf die DNA-Menge bezogenen Wert.

Durch die quantitative Messung der DNA-Menge konnte gezeigt werden, dass in allen Gruppen über die Laufzeit von 21 Tagen die DNA-Menge und folglich die Zellzahl in den Aggregaten abnimmt. Am höchsten blieb die DNA-Menge, welche in allen 4 Versuchsgruppen denselben Ausgangswert hatte (siehe Abb. 3.27), nach 21 Tagen Kultivierung in der Gruppe mit beiden Wachstumsfaktoren, gefolgt von der mit dem alleinigen Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 (siehe Abb. 3.28, Abb. 3.29). Die höhere DNA-Menge in der Gruppe mit beiden Wachstumsfaktoren war sowohl gegenüber der Gruppe nur mit TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,036$ ) als auch gegenüber der Gruppe nur mit BMP-7 ( $p=0,043$ ) signifikant. In den beiden Aggregatgruppen ohne TGF- $\beta$ 1 ging die DNA-Menge nach 21 Tagen auf unter 10% ihres Ausgangswertes vom ersten Tag zurück bzw. war nach 21 Tagen so niedrig, dass der Wert nicht mehr zuverlässig zu bestimmen war. Nach 14 Tagen Kultivierung konnte analog zu den Werten nach 21 Tagen in der Gruppe mit den Wachstumsfaktoren BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 signifikant mehr DNA nachgewiesen werden als in den beiden Gruppen mit entweder TGF- $\beta$ 1 ( $p=0,024$ ) oder BMP-7 ( $p=0,017$ ). Aufgrund der deutlich höheren Zahl an vitalen Zellen in den Gruppen, welche BMP-7 als Differenzierungsfaktor erhielten, verglichen mit der jeweiligen Gruppe ohne BMP-7 sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21, deutet dies auf einen zellprotektiven Effekt von BMP-7 hin.

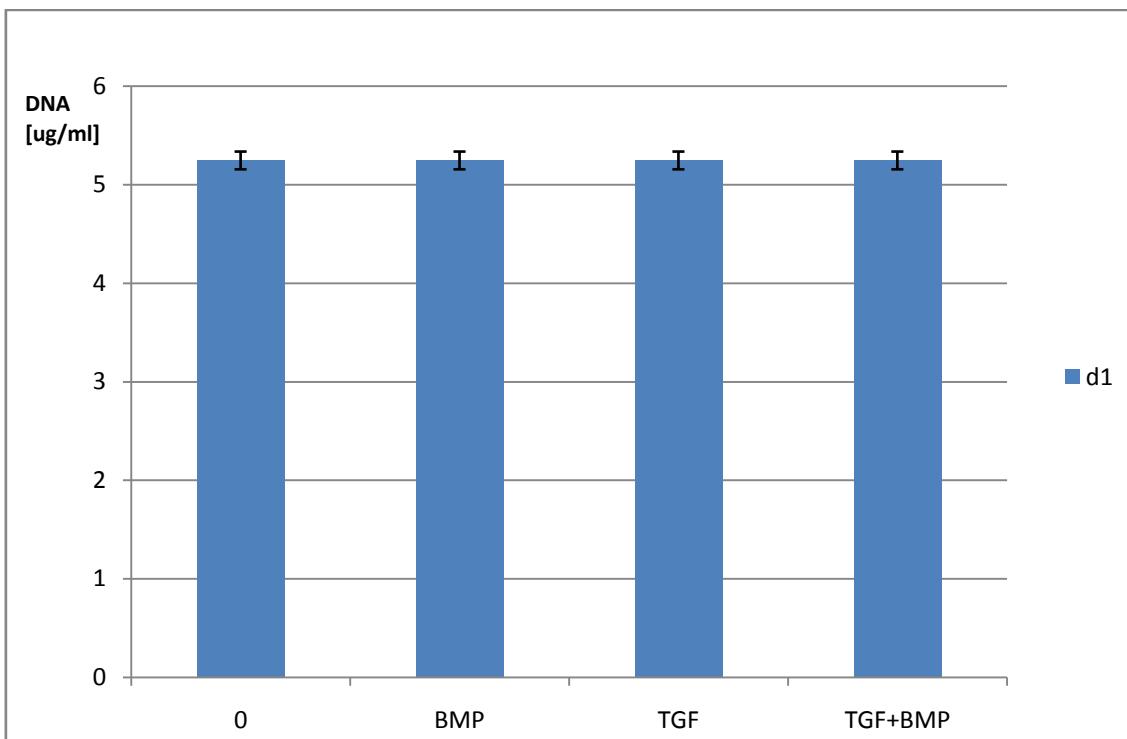


Abbildung 3.27 Mittelwerte der DNA-Konzentrationen aller Zelllinien an Tag 1

\*p<0,05

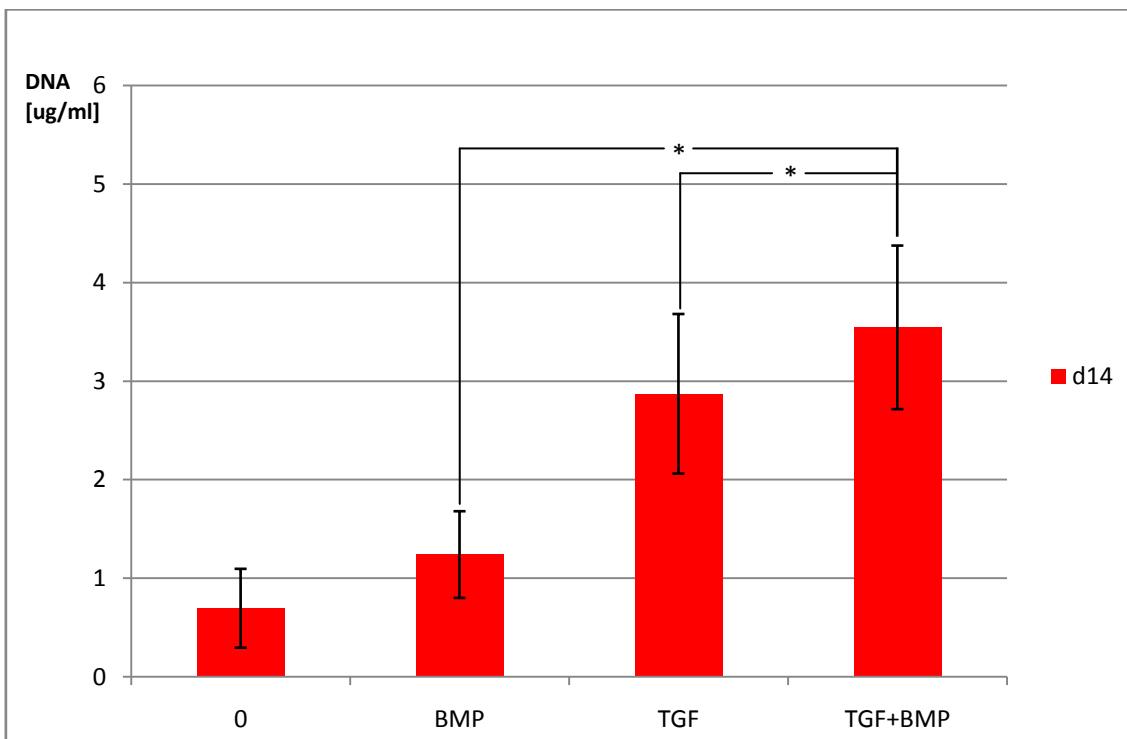


Abbildung 3.28 Mittelwerte der DNA-Konzentrationen aller Zelllinien an Tag 14

\*p<0,05

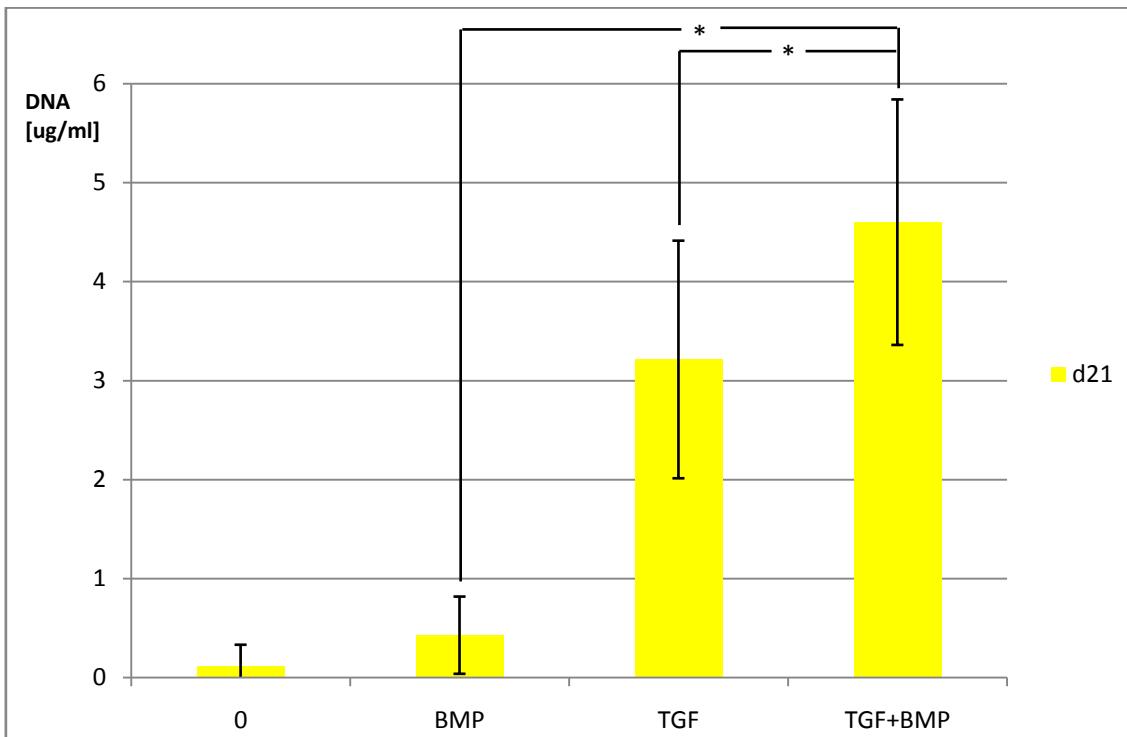


Abbildung 3.29 Mittelwerte der DNA-Konzentrationen aller Zelllinien an Tag 21

\*p&lt;0,05

### **3.7 Behandlung eines Meniskusstanzdefektes *in vivo***

#### **3.7.1 Meniskusdefektregeneration durch Behandlung mit einer zellfreien Kompositmatrix und 1 µg BMP-7**

3 Monate nach Implantation einer Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix und Zugabe von 1µg BMP-7 zeigte sich makroskopisch ein sehr heterogenes Bild, wobei die Reparatur der Meniskusstanzdefekte zwischen den einzelnen Kaninchen individuell sehr unterschiedlich erschien. Bei allen 6 Kaninchen war zumindest eine partielle Füllung des Defekts zu sehen. Das entstandene Gewebe imponierte insgesamt nicht sehr stabil (siehe Abb. 3.30). In keinem der behandelten Gelenke zeigten sich ein Infekt, Erguss, Knorpelschäden oder Verknöcherungen.

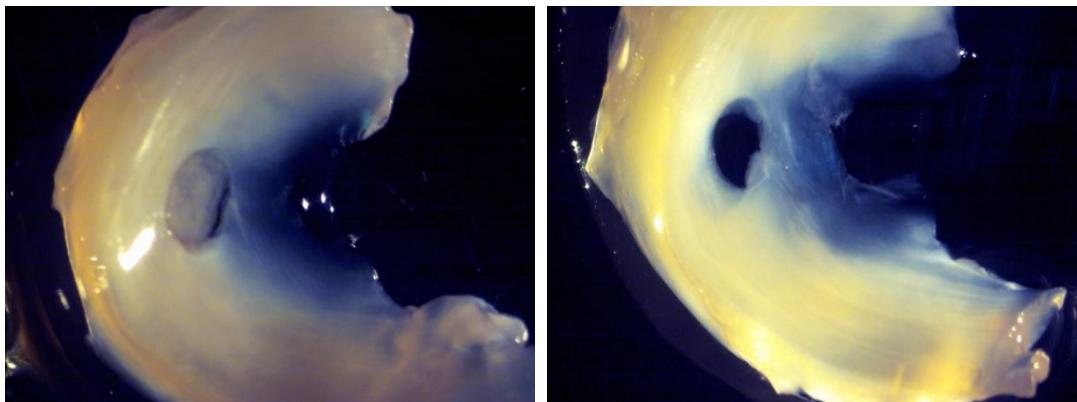
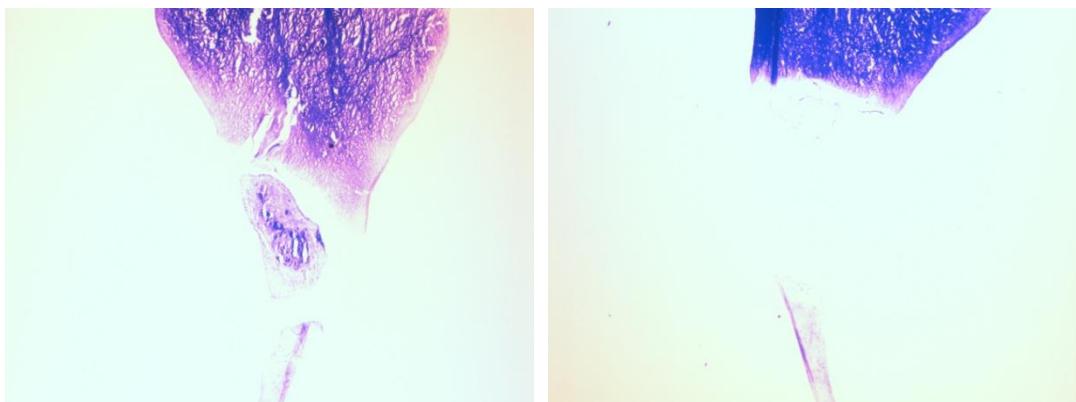


Abbildung 3.30 Makroskopische Ansicht zweier Menisken mit einer zellfreien Matrix und 1 µg BMP-7 behandelt

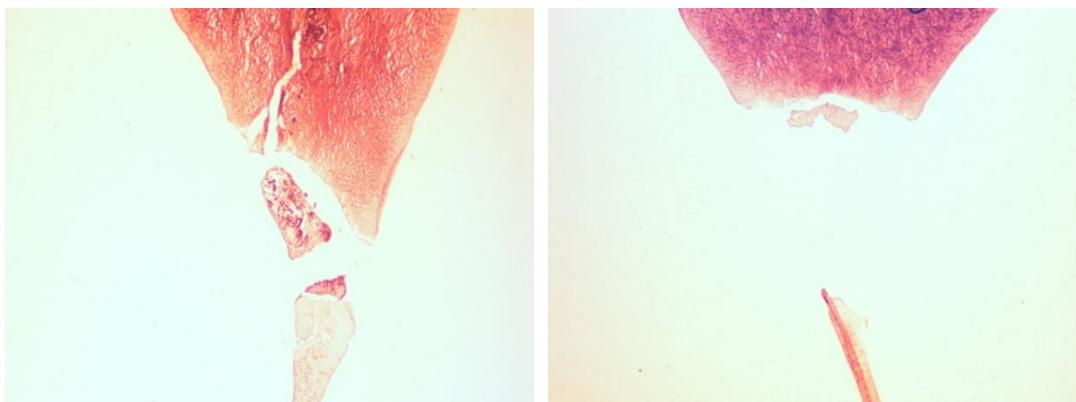
Histologisch waren sowohl bindegewebige Areale als auch knorpeltypische Gebiete mit perizellulären Knorpelhöfen abgrenzbar. Diese waren sowohl Proteoglykan- als auch Kollagen II haltig (siehe Abb. 3.31). Eine alkalische Phosphatase Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.



DMMB-Färbung



Kollagen II-Immunhistochemie



Alkalische Phosphatase-Färbung

Abbildung 3.31 Histologische Ansicht eines Meniskus 3 Monate nach Implantation einer zellfreien Matrix und 1 µg BMP-7 (linke Bildreihe), sowie des entsprechenden Kontrollmeniskus nach Implantation einer zellfreien Matrix (rechte Bildreihe)

In der Kontrollgruppe, in welcher der Stanzdefekt nur mit einer zellfreien Matrix besetzt wurde, zeigte sich makroskopisch ebenfalls ein individuell sehr unterschiedliches Bild des Reparaturgewebes. Im Schnitt imponierte die Füllung jedoch geringfügig instabiler als in der behandelten Gruppe. Histologisch konnte auch in dieser Gruppe fibröses Gewebe und auch vereinzelt Inseln mit fibrokartilaginärem Gewebe nachgewiesen werden. Diese zeigten auch eine Proteoglykan- und Kollagen II-Expression.

Beim Scoring des entstandenen Reparaturgewebes nach oben genanntem Scoringssystem kamen die mit einer zellfreien Matrix und 1 µg BMP-7 behandelten Menschen auf einen durchschnittlichen Wert von 11,7 von 24 Punkten. Die Kontrollgruppe erreichte einen durchschnittlichen Wert von 9,5 von 24 Punkten. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht signifikant ( $p=0,47$ ).

### **3.7.2 Meniskusdefektregeneration durch Behandlung mit einem nicht vorkultivierten Konstrukt aus mesenchymalen Stammzellen, einer Kompositmatrix und 1 µg BMP-7**

3 Monate nach Implantation eines Zell-Matrix-Konstrukts aus mesenchymalen Stammzellen des jeweiligen Kaninchens, einer Gelatine-Hyaluronsäurematrix und 1 µg BMP-7 zeigte sich makroskopisch bei allen 6 Fällen eine subtotale bzw. komplett Füllung des Stanzdefektes (siehe Abb. 3.32). In allen Fällen war der Defekt noch abgrenzbar. Dieses Reparaturgewebe imponierte teilweise druck- und zugelastisch, teilweise jedoch auch weich und gerissen. Insgesamt wies auch diese Gruppe deutliche individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Kaninchen auf.

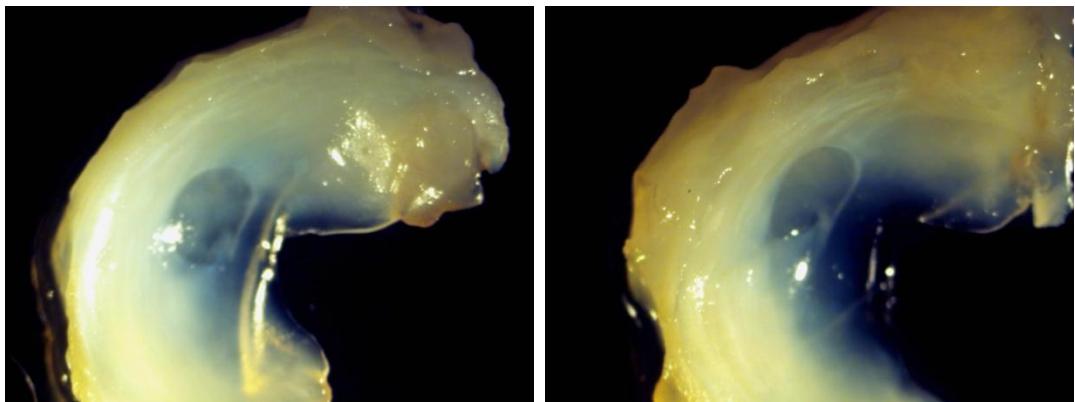
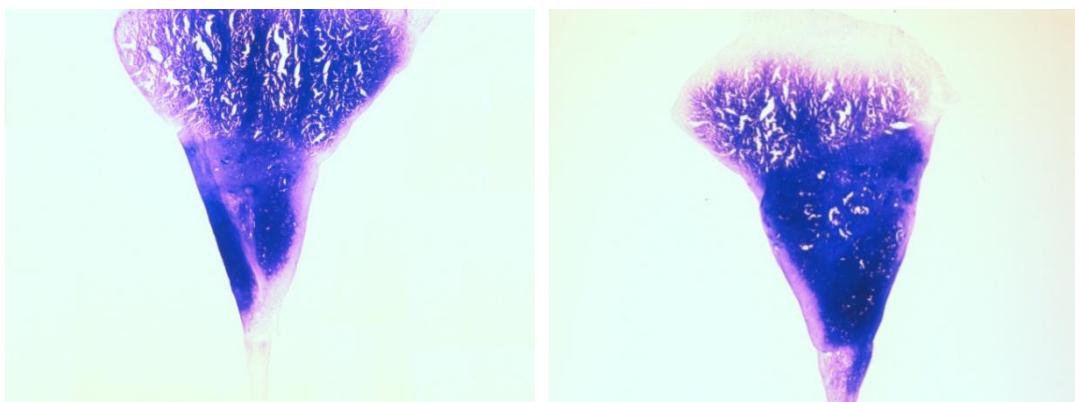


Abbildung 3.32 Makroskopische Ansicht zweier Menisken mit einer MSC-besetzten Matrix sowie 1 µg BMP-7 behandelt

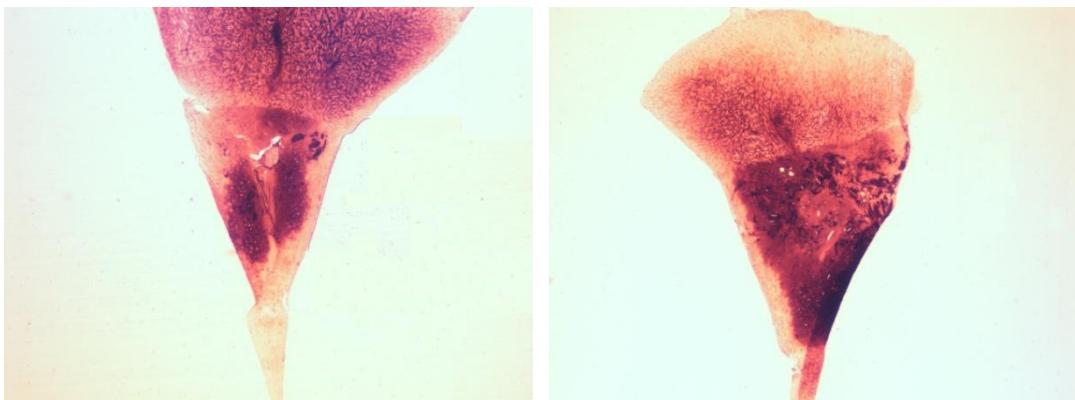
Histologisch zeigten sich die komplett bzw. teilweise ausgefüllten Stanzdefekte fibrokartilaginös durchbaut mit perizellulären Knorpelhöfen. Der Aufbau war teilweise bereits meniskusähnlich, aber auch bindegewebige Areale waren noch nachweisbar. In dem Reparaturgewebe waren sowohl Proteoglykane als auch Kollagen II anfärbbar (siehe Abb. 3.33). Alkalische Phosphatase war nur in geringen Mengen anfärbbar.



DMMB-Färbung



Kollagen II-Immunhistochemie



Alkalische Phosphatase-Färbung

Abbildung 3.33 Histologische Ansicht eines Meniskus 3 Monate nach Implantation eines MSC-Matrix-Konstrukts mit 1 µg BMP-7 (linke Bildreihe), sowie des entsprechenden Kontrollmeniskus nach Implantation einer zellfreien Matrix (rechte Bildreihe)

In der Kontrollgruppe wurde eine zellfreie Matrix in den Stanzdefekt implantiert. Hier zeigte sich ebenfalls ein individuell sehr unterschiedliches Ergebnis, mit sehr unterschiedlichem Füllungsgrad der Stanzdefekte. Diese waren jedoch noch deutlicher abgrenzbar als in der behandelten Gruppe und wirkten auch wesentlich instabiler. Histologisch enthielten die Menisken dieser Gruppe deutlich weniger meniskusähnliches, fibrokartilaginöses Gewebe und dafür deutlich mehr bindegewebige Defektfüllung.

Beim Scoring dieser Gruppe erreichte die Defektreparatur durch eine mit mesenchymalen Stammzellen beimpfte Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix in Kombination mit 1 µg BMP-7 einen Durchschnittswert von 11,3 von 24 möglichen Punkten. Die Kontrollgruppe, bei welcher eine zellfreie Matrix implantiert wurde, erzielte durchschnittlich 8,7 von 24 Punkten. Dieses Ergebnis hat in dem gepaarten T-Test einen p-Wert von 0,13 und ist damit nicht signifikant.

### **3.7.3 Meniskusdefektregeneration durch Behandlung mit einem 14 Tage vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukt**

Nach Beimpfen der Gelatine-Hyaluronsäurematrices mit mesenchymalen Knochenmarkstammzellen wurde dieses Zell-Matrix-Konstrukt für 14 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium mit 50 ng/ml BMP-7 und 10 ng/ml TGF-β1 vorkultiviert. Anschließend wurde dieses Konstrukt in einen Meniskusstanzdefekt des jeweiligen Kaninchens implantiert. Nach 3 Monaten Laufzeit zeigte sich makroskopisch bei 5 von 6 behandelten Menisken eine fast komplett bzw. komplett Füllung des Stanzdefektes, wenngleich auch der Defekt noch makroskopisch abgrenzbar war (siehe Abb. 3.34).

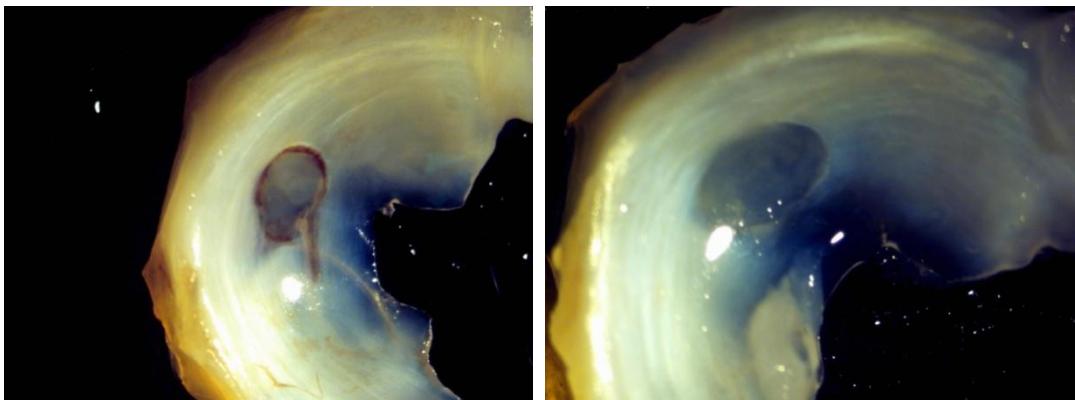
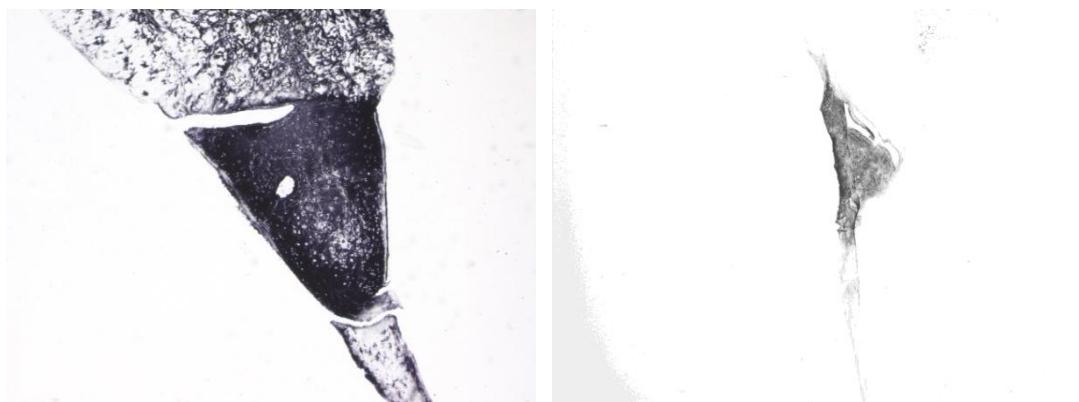


Abbildung 3.34 Makroskopische Ansicht zweier Menisken, mit einer 14 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium vorkultivierten MSC-besetzten Matrix behandelt

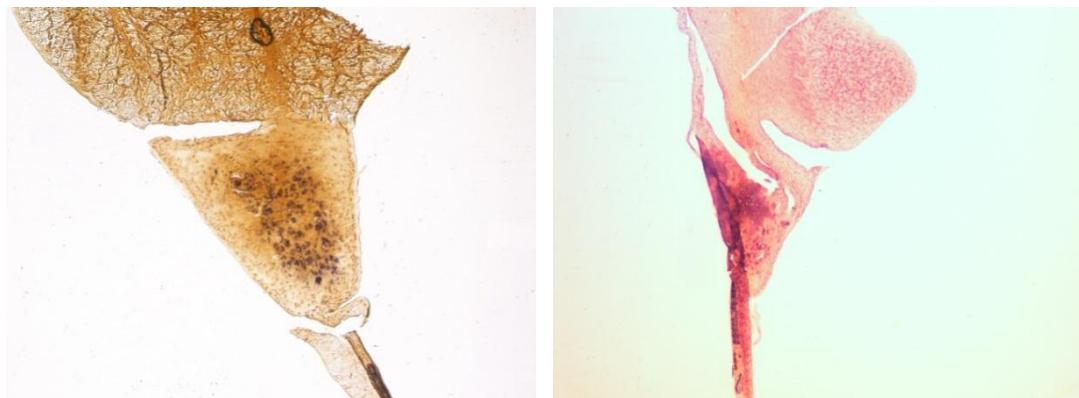
Histologisch zeigte sich das Reparaturgewebe fast durchwegs meniskusähnlich ohne größere fibrotische Areale sowie deutlicher Anfärbbarkeit von Proteoglykanen und Kollagen II (siehe Abb. 3.35). In einigen Menisken waren in dem Reparaturgewebe geringe Mengen von alkalischer Phosphatase anfärbbar, was für eine Hypertrophie der Knorpelzellen spricht. Insgesamt war das Erscheinungsbild der Menisken auf der behandelten Seite relativ homogen ohne große individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren. Bei den Kontrollmenisken zeigte sich teilweise auch eine gute Defektfüllung, das Reparaturgewebe war allerdings deutlich weniger meniskusähnlich, instabiler und wies mehr fibrotische Areale auf (siehe Abb. 3.35).



DMMB-Färbung



Kollagen II-Immunhistochemie



Alkalische Phosphatase-Färbung

Abbildung 3.35 Histologische Ansicht eines Meniskus 3 Monate nach Implantation eines 14 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium vorkultivierten MSC-Matrix-Konstrukts (linke Bildreihe), sowie des entsprechenden Kontrollmeniskus nach Implantation einer zellfreien Matrix (rechte Bildreihe)

Im kontralateralen Knie, bei welchem eine zellfreie Matrix als Kontrolle implantiert wurde, war die Defektfüllung deutlich inhomogener und inkomplettier als in der behandelten Gruppe. Das entstandene Gewebe enthielt deutlich mehr fibröse Areale und imponierte wesentlich weicher und instabiler.

Dies bestätigte sich beim Scoring des Reparaturgewebes, bei welchem die mit dem vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukt behandelte Gruppe durchschnittlich 15,7 von 24 möglichen Punkten erhielt, während dies bei der Kontrollgruppe lediglich 8,3 von 24 Punkten waren. Dieses Ergebnis ist mit dem gepaarten T-Test mit einem P-Wert von 0,033 signifikant.

Diese Versuchsgruppe erreichte von allen 3 untersuchten Gruppen die höchste durchschnittliche Scoring-Punktzahl (siehe Abb. 3.36).

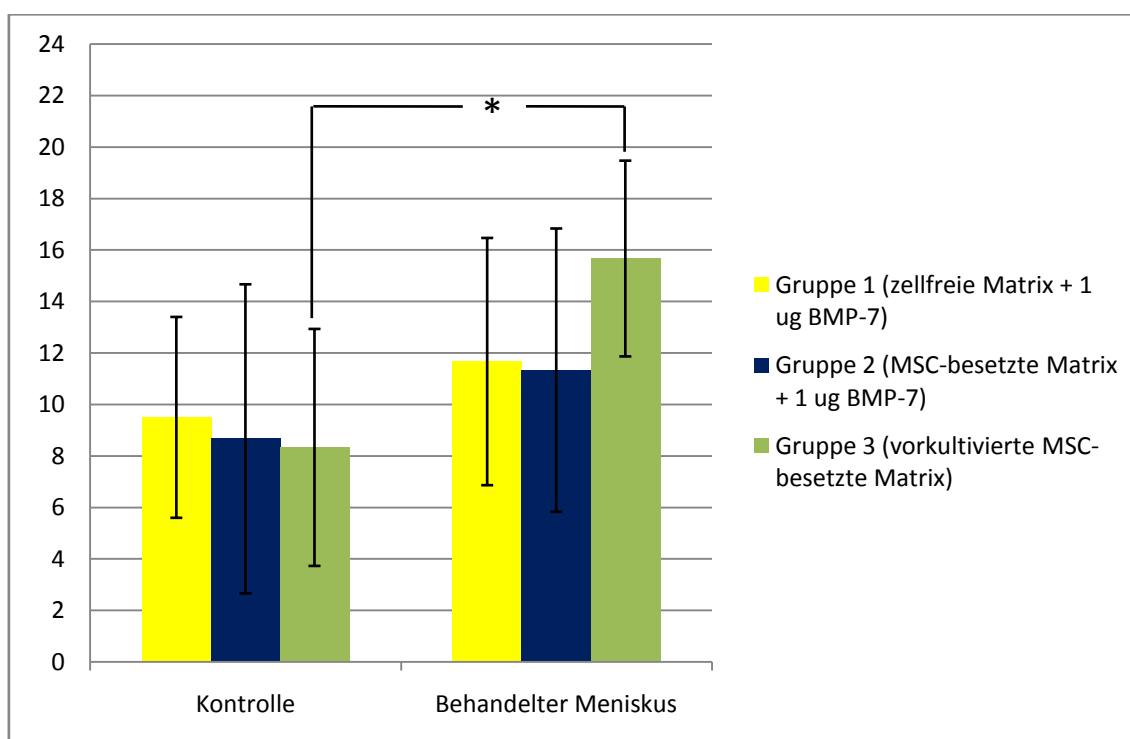


Abb. 3.36 Scoring-Punktzahlen aller 3 Versuchsgruppen nach 3 Monaten Laufzeit  
Gepaarter T-Test: \* $p<0,05$

#### **4. DISKUSSION**

Meniskusläsionen im avaskulären Bereich sind eine nach wie vor nur unbefriedigend zu therapierende Verletzung. Entsprechend gibt es auch viele Forschungsansätze um die Therapie zu verbessern. Mit der hier vorgestellten Arbeit konnte die erfolgreiche Reparatur eines Defektes im avaskulären Anteil des Meniskus durch Implantation einer mit mesenchymalen Knochenmarkstammzellen besetzten Gelatine-Hyaluronsäurematrix unter Zugabe des Wachstumsfaktors BMP-7 gezeigt werden.

In der Behandlung von Meniskusverletzungen im avaskulären Teil sollten durch die Therapie möglichst keine Veränderungen in der Kraftverteilung und folglich der biomechanischen Beanspruchungen entstehen, um keine präarthrotische Deformität zu schaffen. Folglich bietet sich das Tissue-Engineering, welches die Herstellung von Gewebe aus Matrices, Zellen sowie Wachstumsfaktoren, das dem natürlichen Gewebe möglichst ähnlich ist, darstellt, als sehr aussichtsreicher Therapieansatz hierfür an, obwohl der Kniemeniskus eine sehr komplexe Struktur ist, welche aus mehreren unterschiedlichen Komponenten besteht.

Wachstumsfaktoren spielen eine zentrale Rolle im Bereich des Tissue-Engineering des Meniskus. Ein unselektives Gemisch von Wachstumsfaktoren wie sie im platelet rich plasma enthalten sind, scheint, wie von Zellner et al. gezeigt, hierzu allerdings nicht geeignet zu sein [103].

Ein im Zusammenhang mit Meniskusläsionen bisher sehr wenig erforschter Wachstumsfaktor ist BMP-7. Die bisherigen Studien über BMP-7 untersuchten in erster Linie dessen osteogenes Potential. Im Gegensatz zur Anwendung bei Meniskusläsionen existieren in diesem Anwendungsbereich bereits klinische Erfahrungen [22, 37, 71, 72, 98].

BMP-7 wirkt auch auf die Chondrogenese und kann bei multipotenten Zellen die Differenzierung zu Chondrozyten induzieren. So konnten Nahoko et al. bei bovinen Synovialzellen durch Zugabe von BMP-7 die Differenzierung in einen chondrozytischen Phänotyp induzieren. Bei Verwendung von BMP-7 als alleinigen Wachstumsfaktor ist hierfür allerdings eine Konzentration von mindestens 200 ng/ml erforderlich [12].

Übereinstimmend dazu konnten Shen et al. bei mesenchymalen Stammzellen einen dosisabhängigen Effekt auf die Chondro- beziehungsweise Osteogenese zeigen. Durch die Kultivierung der Zellen mit 250 ng/ml BMP-7 wurde sowohl eine Chondrogenese als auch eine Osteogenese induziert. Mit hoher BMP-7-Konzentration stiegen sowohl die Expression von Kollagen II, als auch die von Osteocalcin, einem Marker für osteogene Differenzierung, an. Folglich kommt es bei hohen Konzentrationen zu einer Hypertrophie der Chondrozyten [23]. Aus diesem Grund musste versucht werden die für die chondrogene Differenzierung notwendige BMP-7-Konzentration gering zu halten, weshalb die Kombination mit TGF- $\beta$ 1 erfolgte. Dieser Wachstumsfaktor kann bei Synovialzellen *in vitro* eine chondrogene Differenzierung induzieren [49]. Bei mesenchymalen Stammzellen konnte durch die Kultivierung unter Zugabe von TGF- $\beta$ 1 eine chondrogene Differenzierung mit einer gesteigerten Produktion von proteoglykanreicher extrazellulärer Matrix sowie Kollagen II erreicht werden [18, 49]. Kim et al. zeigten, dass die Kombination von 5 ng/ml TGF- $\beta$ 2 mit 100 ng/ml BMP-7 bei humanen Adipozyten-mesenchymalen Stammzellen sehr effektiv die Chondrogenese induzieren kann [43]. Ein weiterer, für die Heilung von Meniskusläsionen hilfreicher, Effekt von BMP-7 könnte seine zellprotektive Wirkung sein. Diesbezüglich wurde von Hurtig et al. bereits an einem Schafmodell gezeigt, dass BMP-7 nach einem akuten Knorpeltrauma die Zahl an apoptotischen Zellen signifikant reduzieren kann [41, 68]. In unseren Versuchen zeigte sich dazu passend bei humanen mesenchymalen Stammzellen in der Zellaggregatkultur bei gleichzeitiger Zugabe von TGF- $\beta$ 1 sowie BMP-7 mit steigender Konzentration an BMP-7 ein deutlicher Anstieg der gebildeten Kollagen-II-Menge. Die Zellaggregate nahmen auch makroskopisch deutlich an Größe zu. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Shen et al., welche ebenfalls mit zunehmender BMP-7-Konzentration eine Steigerung der Chondrogenesemarker nachwiesen. Mit zunehmender Konzentration konnte jedoch auch ein zunehmend breiter werdender, alkalische Phosphatase exprimierender Randsaum beobachtet werden, was für eine beginnende Hypertrophie der Chondrozyten spricht. Ohne gleichzeitige Zugabe von TGF- $\beta$ 1 zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Kollagen-II-Menge mit steigender BMP-7-Konzentration, jedoch wurden absolut gesehen nur

deutlich geringere Werte gemessen. Mit BMP-7 als alleinigen Differenzierungsfaktor wurde, wie oben angesprochen, bei Synovialzellen eine minimale Dosis von 200 ng/ml für die chondrogene Differenzierung herausgefunden [12]. Diese Dosis erreichte auch bei uns unter Verwendung von mesenchymalen Stammzellen die höchste Kollagen II – und Proteoglykan-Expression, jedoch konnte auch hier eine deutliche Aktivität der alkalischen Phosphatase als Hinweis auf eine Zellhypertrophie beobachtet werden, so dass sie für den Einsatz in der Meniskusreparatur nicht in Frage kam. Als geeigneter Kompromiss erschien uns deshalb bei humanen mesenchymalen Stammzellen die Kombination aus 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 100 ng/ml BMP-7, da sich in dieser Gruppe eine sehr gute chondrogene Differenzierung bei lediglich minimaler Expression von alkalischer Phosphatase einstellte. Ein weiterer interessanter Aspekt hinsichtlich der Aktivität der alkalischen Phosphatase ist, dass ihre Expression durch die kombinierte Zugabe beider Wachstumsfaktoren früher einsetzt und deutlich ausgeprägter ist als bei Differenzierung unter TGF- $\beta$ 1. BMP-7 selbst wurde bereits als die Expression osteogener Markerproteine fördernd beschrieben, wenngleich auch in höherer Konzentration als der hier verwendeten [23]. Entgegen dieser Ergebnisse wurde TGF- $\beta$ 1 in der Literatur als die Hypertrophie verhindernd vorbeschrieben [9]. Ein additiver Effekt dieser beiden Wachstumsfaktoren bezüglich der Zellhypertrophie wurde bisher nicht beschrieben.

Der quantitative Vergleich der gebildeten Kollagen II-Menge bei kombinierter Zugabe von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 sowie 100 ng/ml BMP-7 ergab nach 21 Tagen Differenzierung bei allen Zelllinien einen deutlichen Anstieg verglichen mit der alleinigen Zugabe von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1. Dieser Unterschied ist jedoch mit einem p-Wert von 0,17 nicht signifikant, was allerdings auch Folge der sehr großen individuellen Unterschiede zwischen den Zelllinien sein kann. Auch ergaben sich Hinweise, dass durch die kombinierte Gabe der beiden Wachstumsfaktoren eine frühere Chondrogenese erreicht werden kann als durch die alleinige Gabe von TGF- $\beta$ 1. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant und vergleichbare Ergebnisse sind in der bisherigen Literatur nicht beschrieben. Verglichen mit der Gruppe, welche lediglich TGF- $\beta$ 1 als Differenzierungsfaktor erhielt, konnten wir in der kombinierten Gruppe sowohl nach

14, als auch nach 21 Tagen Differenzierung signifikant höhere DNA-Konzentrationen messen, was für eine höhere Zahl an noch vitalen Zellen spricht. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Zugabe von BMP-7 protektiv auf das Zellüberleben wirkt.

In einer *in vivo*-Studie an Schafen konnte die erfolgreiche Reparatur eines Gelenkknorpeldefekts durch eine zweiwöchige kontinuierliche Injektion von BMP-7 mit einer implantierten osmotischen Pumpe gezeigt werden [47]. In einem Pferdemodell mit einem fokalen chondralen Defekt wurde ebenfalls eine signifikant bessere Defektheilung als in der Kontrollgruppe erreicht [36]. Die Datenlage zur Wirkung von BMP-7 auf Meniskusläsionen ist bislang sehr dünn.

Für einen eventuellen späteren klinischen Einsatz ist die Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien ein wesentlicher, die Durchführbarkeit der Therapie bestimmender Faktor. Auch sollten möglichst wenige operative Eingriffe notwendig sein, um das Risiko und die Belastung für den Patienten möglichst gering zu halten. Folglich wäre es optimal, wenn nur eine Operation notwendig wäre, sowie keine Gewinnung von Zellen des Patienten. Es konnte allerdings bereits von Zellner et al. gezeigt werden, dass die Zugabe eines Wachstumsfaktorgemisches in Form von platelet-rich-plasma zu keiner Verbesserung der Heilung von avaskulären Meniskusdefekten führt [103]. Aus diesen Überlegungen heraus gestalteten wir eine unserer *in vivo*-Versuchsgruppen: Im avaskulären Teil des Meniskus wurde ein 2mm messender, runder Stanzdefekt gesetzt, welcher mit einer Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix sowie einer einmaligen Gabe von 1 µg BMP-7 gefüllt wurde. Da Angele et al. zeigen konnten, dass durch diese Matrix gegenüber dem nicht gefüllten Defekt eine signifikante Verbesserung in der Defektheilung erzielt werden kann [3], verwendeten wir im kontralateralen Knie nur eine Matrix zur Defektfüllung als Kontrolle, um Verfälschungen des Ergebnisses durch die Effekte der Matrix zu vermeiden. Nach 12 Wochen Laufzeit zeigte sich im Scoring des entstandenen Reparaturgewebes ein geringfügig höherer Punktewert bei den behandelten Läsionen als in der Kontrollgruppe, jedoch war das Bild zwischen den Versuchstieren extrem

heterogen und das Ergebnis nicht signifikant. Mit BMP-7 alleine kann also keine Meniskusreparatur erreicht werden.

Zur Verbesserung des Therapieerfolges liegt die Implantation einer zellbesetzten Matrix nahe. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit verzichteten wir auf die Verwendung originärer Meniskus- oder Knorpelzellen, stattdessen griffen wir auf multipotente mesenchymale Knochenmarkstammzellen zurück. Für diese Zellen konnten bereits Ischimura et al. 1997 eine Verbesserung der Heilung avaskulärer Meniskusdefekte bei Kombination mit einem Fibrinclot, verglichen mit der alleinigen Behandlung der Läsion mit einem Fibrinclot, nachweisen.

Des weiteren konnten Angele et al. die Reparatur eines kombinierten vaskulär-avaskulären Meniskusdefektes in der Pars intermedia des Meniskus durch Implantation einer 14 Tage vorkultivierten, mit aufgereinigten und bis zur Konfluenz angezüchteten mesenchymalen Stammzellen besetzten Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix zeigen. Nach drei Monaten Laufzeit zeigte sich sowohl eine gute Defektfüllung mit meniskusähnlichem Gewebe als auch eine gute Integration des entstandenen Gewebes in das umliegende Meniskusgewebe. In der Kontrollgruppe, bei welcher lediglich die zellfreie Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix implantiert wurde, konnte diese Reparatur nicht beobachtet werden. Da generell die Defektheilung im avaskulären Teil des Meniskus deutlich problematischer ist als im vaskulären Anteil, wurde von Zellner et al. die Reparatur eines avaskulären Meniskusstanzdefekts in der Pars intermedia des Meniskus untersucht. Nach Ablauf der drei Monate konnte auch hier in der Gruppe mit der mit mesenchymalen Stammzellen besetzten, 14 Tage vorkultivierten Matrix eine Ausfüllung des Defektes mit meniskusähnlichem Gewebe beobachtet werden, welches jedoch im Schnitt schlecht in den Meniskus integriert war. Eine deutlich bessere Integration des neu entstandenen Reparaturgewebes und signifikant bessere Defektheilung als in der Kontrollgruppe zeigte sich bei sofortiger Implantation der zellbesetzten Matrix in den Meniskusdefekt ohne vorherige Kultivierung im Differenzierungsmedium [103].

Neben den offensichtlichen Vorteilen, welche diese Zellen bezüglich der guten Verfügbarkeit und der fehlenden Gefahr von Abstoßungsreaktionen mit sich bringen,

da es sich um körpereigene Zellen handelt, gibt es für einen klinischen Einsatz natürlich auch Nachteile und Risiken zu bedenken. Zum einen bedeutet die Gewinnung der Zellen einen zweiten Eingriff an einer anderen Körperstelle, welcher selbstverständlich auch mit seinen eigenen Risiken, wie Blutung oder Infektion, verbunden ist. Zum anderen bedeutet die notwendige Aufreinigung und Anzucht der mesenchymalen Stammzellen einen erheblichen personellen und finanziellen Aufwand.

Aufgrund dieser Ergebnisse erachteten wir trotz der damit verbundenen Nachteile und Risiken mesenchymale Stammzellen als die am besten geeignete Zellquelle und untersuchten zwei weitere Gruppen *in vivo*. Einer Versuchsgruppe wurde in den Meniskusstanzdefekt eine mit mesenchymalen Stammzellen besetzte Matrix unter der einmaligen Zugabe von 1 µg BMP-7 implantiert. Kontrolle war auch hier die zellfreie Matrix. Auch in dieser Gruppe gab es individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren, jedoch zeigte sich insgesamt eine gute Integration des entstandenen Gewebes. Dieses war stabil in dem umgebenden Meniskusgewebe verankert. Beim Scoring des Reparaturgewebes nach vorbeschriebenem System zeigte sich eine deutliche Verbesserung des therapeutischen Resultats gegenüber der Kontrollgruppe, welche allerdings mit einem p-Wert von 0,13 nicht signifikant war. Interessant hierbei ist, dass von Zellner et al. durch die Implantation einer mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Matrix eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant bessere Defektheilung erreicht werden konnte, was hier bei Zugabe des als chondrogeneseinduzierend und zellprotektiv beschriebenen BMP-7 nicht der Fall war. Um zu untersuchen, ob die 14-tägige Vorkultur der zellbesetzten Matrices in chondrogenem Kulturmedium mit einer geeigneten Konzentration von BMP-7 und anschließende Implantation in den avaskulären Meniskusstanzdefekt eine verbesserte Heilung bewirken kann, untersuchten wir eine weitere *in vivo*-Gruppe.

Die Ergebnisse unserer *in vitro*-Versuche zeigten, dass mit der Kombination aus BMP-7 in geeigneter Konzentration sowie TGF-β1 eine chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Kaninchenstammzellen induziert werden kann. Da nicht selbstverständlich davon ausgegangen werden konnte, dass sich mesenchymale Kaninchenstammzellen genauso verhalten würden wie humane, mussten wir in einem

Vorversuch auch für diese die optimale Dosis an BMP-7 für die Vorkultivierung ermitteln. Es zeigte sich bei allen Zelllinien ein höchster Wert der Kollagen-II-Konzentration bei Zugabe von 50 ng/ml BMP-7 zu dem Differenzierungsmedium. Auch bei den Kaninchenstammzellen konnte ein Anstieg der Expression von alkalischer Phosphatase mit steigender BMP-7-Konzentration beobachtet werden, so dass auch in diesem Fall unbedingt eine zu hohe Konzentration vermieden werden musste. Als guter Wert erschien 50 ng/ml BMP-7, da bei dieser Konzentration die Expression von alkalischer Phosphatase noch sehr gering war und der Chondrogenesemarker Kollagen-II seinen höchsten Wert aufwies.

In dieser Gruppe zeigte sich eine sehr gute Defektfüllung und Integration des entstandenen Gewebes, ohne dass große individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren auftraten. Das Reparaturgewebe entsprach histologisch weitestgehend Meniskusgewebe mit geringen fibrotischen Anteilen und war beim Scoring gegenüber der Kontrollgruppe signifikant besser. Verglichen mit den beiden anderen Versuchsgruppen erreichte diese Gruppe die höchste durchschnittliche Punktzahl beim Scoring und folglich auch die beste Defektreparatur. Zu bedenken ist allerdings, dass bei einigen Menisken im entstandenen Gewebe alkalische Phosphatase nachgewiesen werden konnte, was für eine beginnende Hypertrophie der Chondrozyten sprechen könnte. Folglich wäre eine Weiterdifferenzierung in osteogene Zelllinien denkbar, insbesondere da gezeigt werden konnte, dass BMP-7 *in vivo* zu einer Knochenneubildung in einer Kollagenmatrix führen kann [80]. Für einen Einsatz in der Meniskusreparatur wäre die Gefahr der Verknöcherung von Meniskusanteilen natürlich limitierend, da eine solche verstärkt zu degenerativen Gelenkveränderungen führt [94]. Da dies auch bei den Kontrollmenisken, welchen lediglich eine zellfreie Matrix implantiert wurde, der Fall war, ist dies möglicherweise auch unspezifisch und nicht Folge des Wachstumsfaktors. In diesem Zusammenhang kann auch ein Einfluss des Wachstumsfaktors FGF, welcher für die Anzucht der Stammzellen verwendet wurde, nicht ausgeschlossen werden, insbesondere da bereits gezeigt werden konnte, dass FGF die Hypertrophie von Chondrozyten induzieren kann [28, 40].

Da diese Gruppe für einen eventuellen klinischen Einsatz von den hier untersuchten die vielversprechendste ist, ist diesbezüglich eine weitere Evaluation sinnvoll. Insbesondere eine genaue Austestung der für die Meniskusreparatur optimalen Konzentration an BMP-7 ist dringend erforderlich, da in der bisherigen Literatur keine geeignete Konzentration hierfür beschrieben ist und auch die in diesem Versuch verwendete Einmalgabe von 1 µg BMP-7 auf keiner validierten Grundlage beruht. Selbstverständlich müssen die so hergestellten Implantate nicht nur bezüglich des Verhaltens der alkalischen Phosphatase, sondern auch sonst noch weiter untersucht werden. Hierfür wären insbesondere *in vivo*-Testungen mit deutlich längeren Laufzeiten sinnvoll, um die Langzeitstabilität, die dauerhaften Folgen der Implantate für den angrenzenden Gelenkknorpel und auch für die benachbarten Anteile des originären Meniskus sowie anderweitige derzeit nicht bekannte negative Folgen der Behandlung zu evaluieren.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Meniskusläsionen im avaskulären Bereich stellen in der Traumatologie nach wie vor ein schwer behandelbares Problem dar. Die derzeit durchgeführte Therapie durch arthroskopisches Entfernen des geschädigten Meniskusanteils führt durch den Materialverlust und die daraus folgenden biomechanischen Veränderungen zu einer präarthrotischen Deformität.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels des Wachstumsfaktors BMP-7 sowohl *in vitro* die Chondrogenese, als auch die Reparatur eines Meniskusstanzdefekts im avaskulären Bereich verbessert werden kann.

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass BMP-7 in steigender Konzentration die Chondrogenese verbessert und sich positiv auf das Überleben der Zellen in der Aggregatkultur auswirkt, was auf einen zellprotektiven Effekt des Wachstumsfaktors hindeutet.

*In vivo* zeigte sich an einem Kaninchenmodell durch die Implantation einer zellfreien Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix in Kombination mit der Gabe von 1 µg BMP-7 keine verbesserte Defektheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine weitere Versuchsgruppe, deren Matrix mit mesenchymalen Stammzellen und 1 µg BMP-7 besetzt war, erzielte eine verbesserte Defektheilung, welche jedoch nicht signifikant war.

Die besten Ergebnisse konnten mit einem für 14 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium mit BMP-7 vorkultivierten Zell-Matrixkonstrukt erzielt werden. Durch die Implantation dieser Matrices wurde der Stanzdefekt signifikant besser gefüllt als in der Kontrollgruppe.

Die gute Defektreparatur in der letztgenannten Gruppe zeigt, dass es mittels Tissue Engineering möglich ist, einen Meniskusschaden auch im avaskulären Bereich ohne zusätzlichen therapeutisch bedingten Verlust an Meniskusgewebe zu behandeln. Problematisch erscheint jedoch die Hypertrophieneigung und die Möglichkeit der Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in eine osteogene Linie durch die Zugabe von BMP-7.

Bei weiterer Evaluierung und Verbesserung des Therapieverfahrens wäre ein zukünftiger Einsatz für die Behandlung derartiger Schäden beim Menschen durchaus vielversprechend.

## **6. LITERATUR**

- 1) Ahmed AM. The load-bearing role of the knee menisci. In: Mow VC, Arnoczky SP, Jackson DW, editors. *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. New York: Raven Press; 1982. p. 59-73.
- 2) Allen PR, Denham RA, Swan AV. Late degenerative changes after meniscectomy. Factors affecting the knee after operation. *J Bone Jt Surg Br* 1984; 66:666-671.
- 3) Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, Yoo J. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85(2):445-455.
- 4) Angele P, Müller M, Schumann D, Englert C, Zellner J, Johnstone B, Yoo J, Hammer J, Fierlbeck J, Angele MK, Nerlich M, Kujat R. Characterization of esterified hyaluronan-gelatin polymer composites suitable for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem-cells. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91(2):416-427.
- 5) Appel H. Late results after meniscectomy in the knee joint. A clinical and roentgenologic follow-up investigation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1970; 133:1-111.
- 6) Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982; 10:90-95.
- 7) Auswertung der GKV-Frequenzstatistik 2004
- 8) Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, Schneyer AL, Woolf CJ, Lin HY. Repulsive Guidance Molecule (RGMa), a DRAGON Homologue, Is a Bone Morphogenetic Protein Co-receptor. *J Biol Chem* 2005; 280(33):29820-29827.
- 9) Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. TGF-beta prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteinases. *Dev. Biol* 1993; 158(2):414-429.
- 10) Berjon JJ, Munuera L, Calvo M. Degenerative lesions in the articular cartilage after meniscectomy: preliminary experimental study in dogs. *J Trauma* 1991; 31:342-350.

- 11) Bhargava MM, Attia ET, Murrell GAC, Dolan MM, Warren RF, Haanafin JA. The effects of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med* 1999; 27:636-643.
- 12) Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press 2002; 929-942.
- 13) Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *International Orthopaedics* 2007; 31:721-727.
- 14) Bos PK, DeGroot J, Budde M, Verhaar JA, vanOsch GJ. Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: implications for integrative cartilage repair. *Arthritis Rheum* 2002; 46:976-985.
- 15) Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RPH. Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials* 2004; 25:1523.
- 16) Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocrine Reviews* 2003; 24(2):218-235.
- 17) Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo formation. *Gene* 2005; 357:1-8.
- 18) Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Skeletal tissue and transforming growth factor beta. *FASEB J* 1988; 2:3066-3073.
- 19) Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *International Orthopaedics* 2007; 31:773-781.
- 20) Chubinskaya S, Otten L, Soeder S, Aigner T, Loeser RF, Rueger DC. Regulation of anabolic and catabolic pathways by osteogenic protein-1: gene array data. *ORS* 2007; 53: 546.
- 21) Collier S, Ghosh P. Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* 1995; 3:127-138.
- 22) Cook SD, Dalton JE, Tan EH, Whitecloud TS, Rueger DC. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as bone graft substitute for spinal fusions. *Spine* 1994; 19(1S):1655-1663.
- 23) Cook SD, Rueger DC. Osteogenic Protein-1 Biology and Applications. *Clin Orthop Res* 1996; 324:29-38.

- 24) Cooper DE, Arnoczky SP, Warren RF. Meniscal repair. Clin Sports Med 1991; 10:529- 548.
- 25) Cummins JF, Mansour JN, Howe Z, Allan DG. Meniscal transplantation and degenerative articular change: an experimental study in the rabbit. Arthroscopy 1997; 13:485-491.
- 26) Dandy DJ. The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions. J Bone Joint Surg Br 1990; 72:628-633.
- 27) DeHaven KE. Meniscectomy versus repair: clinical experience. In: Mow VC, Arnoczy SP, Jackson DW, editors. Knee meniscus: basic and foundations. New York: Raven Press; 1992: 131-139.
- 28) DeLuca F, Baron J. Control of Bone Growth by Fibroblast Growth Factors. Trends Endocrinol Metab 1999; 10(2):61-65.
- 29) Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. J Bone Jt Surg Br 1948; 30:664-670.
- 30) Field JR, Gunatillake P, Adhikari R, Ramshaw JA, Werkmeister JA. Use of biodegradable urethane-based adhesives to appose meniscal defect edges in an ovine model: a preliminary study. Aust Vet J 2008; 86(6):229-234.
- 31) Fox JM, Rintz KG, Ferkel RD. Trehphination of incomplete meniscal tears. Arthroscopy 1993;9:451-455.
- 32) Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. ANZ J Surg 2007; 77:626-631.
- 33) Goble EM, Kohn D, Verdonk R, Kane SM. Meniscal substitutes – human experience. Scand J Med Sci Sports 1999; 9:146-157.
- 34) Haas AR, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. Differentiation 1999; 64(2):77-89.
- 35) Hede A, Svalastoga E, Reimann I. Articular cartilage changes following meniscal lesions. Repair and meniscectomy studied in the rabbit knee. Acta Orthop Scand 1991; 62:319-322.
- 36) Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ.

- Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. J Ortho Res 2003; 21:573-583.
- 37) Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins in development. Current Opinion in Genetics & Development 1996; 6:432-438.
- 38) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?cmd=entry&id=112267>
- 39) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&CHR=20&maps=genesr,pheno,morbid,genec&R1=on&query=BMP7&VERBOSE=ON&ZOOM=3>
- 40) Hung IH, Yu K, Lavine KJ, Ornitz DM. FGF 9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. Dev. Biol. 2007; 307(2):300-313.
- 41) Hurtig M, Chubinskaya S, Dickey J, Rueger D. BMP-7 protects against progression of cartilage degeneration after impact injury. J Orthop Res 2009; 27(5):602-611.
- 42) Hurtig MB, Chubinskaya S. The protective effect of OP-1 in early traumatic osteoarthritis-animal studies. ORS 2004; 4: 70.
- 43) Hye-Joung Kim, Gun-II Im. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Tissue-Engineering 2009; 15(7):1543.
- 44) Ibarra C, Janetta C, Vacanti CA, Cao Y, Kim TH, Upton J, Vacanti JP. Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogenic meniscus transplantation. Transplant Proc 1997; 29:986-988.
- 45) Im HJ, Pacione C, Chubinskaya S, Van Wijnen AJ, Sun Y, Loeser RF. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. J Biol Chem 2003; 278:25386-25394.
- 46) Ishimura M, Ohgushi H, Habata T, Tarnai S, Fuhisawa Y. Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part I: Experimental study. Arthroscopy 1997; 13:551-557.
- 47) Jelic M, Pecina M, Haspl M, Kos J, Taylor K, Maticic D, McCartney J, Yin S, Rueger D, Vukicevic S. Regeneration of articular cartilage chondral

- defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. *Growth Fact* 2001; 19:101-113.
- 48) Johnson LL, Feagin JA. Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study. *Arthroscopy* 2000; 16:191-196.
- 49) Jorgensen C, Noel D, Apparailly F, Sany J. Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:305-309.
- 50) Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blob GC. Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* 2008. Manuscript M704883200.
- 51) Klompmaker J, Jansen HWB, Veth RPH, Nielsen HKL, de Groot JH, Pennings AJ. Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage. *Clin Mater* 1993; 14:1-11.
- 52) Kohn D, Wirth CJ, Reiss G, Plitz W, Maschek H, Erhardt W, Wulker N. Medial meniscus replacement by a tendon autograft. Experiments in sheep. *J Bone Jt Surg Br* 1992; 74:910-917.
- 53) Kohn D. Autograft meniscus replacement: experimental and clinical results. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1993; 1:123-125.
- 54) Kuo AC, Rodrigo JJ, Reddi AH, Curtiss S, Grotkopp E, Chiu M. Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. *OsteoArthritis and Cartilage* 2006; 14:1126-1135.
- 55) Levy IM, Torzilli PA, Fisch ID. The contribution of the menisci to the stability of the knee. In: Mow VC, Jackson DW, Arnoczy SP, editors. *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. New York: Raven Press; 1992. p. 107-115.
- 56) Lintner S, Shawen S, Lohnes J, et al. Local anesthesia in outpatient knee arthroscopy: a comparison of efficacy and cost. *Arthroscopy* 1996; 12:482-488.
- 57) Maker SA, Rodeo SA, Doty SB, Brophy R, Potter H, Foo LF, Rosenblatt L, Deng XH, Turner AS, Wright TM, Warren RF. Evaluation of a Porous Polyurethane Scaffold in a Partial Meniscus Defect ovine Model. *Arthroscopy* 2010; [Epub ahead of print]

- 58) Mariani FV, Harland RM. XBF-2 is a transcriptional repressor that converts ectoderm into neural tissue. *Development* 1998; 125:5019-5031.
- 59) Messner K, Kohn D, Verdonk R. Future research in meniscal replacement. *Scand J Med Sci Sports* 1999; 9:181-183.
- 60) Messner K. The concept of a permanent synthetic meniscus prothesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using dacron and teflon implants. *Biomaterials* 1994; 15:243-250.
- 61) Milachowski KA, Kohn D, Wirth CJ. Meniscus replacement using Hoffa's infrapatellar fat body – initial clinical results. *Unfallchirurgie* 1990; 4:190-195.
- 62) Miyamoto C, Matsumoto T, Sakumura K, Shindo H. Osteogenic protein-1 with transforming growth factor- $\beta$ 1: potent inducer of chondrogenesis of synovial mesenchymal stem cells in vitro. *J Orthop Sci* 2007; 12:555-561.
- 63) Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & Growth factor Rev* 2005; 16:251-263.
- 64) Mow VC, Ratcliffe A, Chern KY, et al. Structure and function relationships of the menisci of the knee. In: Mow VC, Arnoczky SP, Jackson DW, editors. *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. New York: Raven Press; 1992. p. 37-57.
- 65) Mueller SM, Schneider TO, Shortkroff S, Breinan HA, Spector M. Alpha-smooth muscle actin and contractile behavior of bovine meniscus cells seeded in type I and type II collagen GAG matrices. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:157-66.
- 66) Mueller SM, Shortkoff S, Schneider TO, Breinan HA, Yannas IV, Spector M. Meniscus cells seeded in type 1 and type 2 collagen-GAG-matrices in vitro. *Biomaterials* 1999; 20:701-709.
- 67) Müller-Rath R, Mumme T, Miltner O, Andereya S, Schneider U. Meniskusersatz: Aktuelle Aspekte auf dem Gebiet des Tissue engineering. *Z Orthop* 2004; 142: 540-545.
- 68) Nohe A, Hasel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277:5330-5338.
- 69) Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J,

- Niehrs C. Silencing of TGFbeta signaling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999; 401:480-485.
- 70) Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, Ten Dijke P, Sakou T. Distinct and Overlapping Patterns of Localization of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Family Members and a BMP Type II Receptor During Fracture healing in rats. *Bone* 1998; 22:605-612.
- 71) Pecina M, Giltaij LR, Vukicevic S. Orthopaedic applications of osteogenes protein-1 (BMP-7). *Int Orthop* 2001; 25:203-208.
- 72) Pecina M, Haspl M, Jelic M, Vukicevic S. Repair of a resistant tibia non-union with a recombinant bone morphogenetic protein-7 (rh-BMP-7). *Int Orthop* 2003; 27:320-321.
- 73) Poehling GG, Ruch DS, Chabon SJ. The landscape of meniscal injuries. *Clin Sports Med* 1990; 9:539-549.
- 74) Port J, Jackson DW, Lee TQ, Simon TM. Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous culture marrow cells in the goat model. *Am J Sports Med* 1996; 24:547-555.
- 75) Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop* 1986; 34-40.
- 76) Rockborn P, Hamberg P, Gillquist J. Arthroscopic meniscectomy: treatment costs and postoperative function in a historical perspective. *Acta Orthop Scand* 2000; 71:455-460.
- 77) Rodkey WG, Steadman JR, Li ST. A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367(Suppl.):281-292.
- 78) Roldán JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Açıł Y, Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenic protein-7. *Bone* 2004; 34:80-90.
- 79) Roldán JC, Jepsen S, Schmidt C, Knüppel H, Rueger DC, Açıł Y, Terheyden H. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15:716-723.
- 80) Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and

- stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992; 267:20352-20362.
- 81) Satow R, Kurisaki A, Chan TC, Hamazaki TS, Asashima. Dullard Promotes Degradation and Dephosphorylation of BMP Receptors and Is Required for Neural Induction. *Dev Cell* 2006; 11:763-774.
- 82) Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. BMP Treatment of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells Induces Both Chondrogenesis and Osteogenesis. *J Cell Biochem* 2003; 90:1112-1127.
- 83) Shintani N, Hunziker EB. Chondrogenic Differentiation of bovine Synovium. Bone Morphogenetic Proteins 2 and 7 and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Induce the Formation of Different Types of Cartilaginous Tissue. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56(6):1869-1879.
- 84) Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK, Davidson JM. Regional mitogenic response of the meniscus to platelet-derived growth factor (PDGF-AB). *J Orthop Res* 1995; 13:201-207.
- 85) Steadman RJ, Rodkey WG. Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-Year feasibility study results. *Arthroscopy* 2005; 21:515-525.
- 86) Stone KR, Adelson WS, Pelsis JR, Walgenbach AW, Turek TJ. Long-term survival of concurrent meniscus allograft transplantation and repair of the articular cartilage: a prospective two- to 12 year follow-up report. *J Bone Joint Surg Br*. 2010; 92(7):941-948.
- 87) Tanaka M, Endo S, Okudo T, Economides AN, Valenzuela DM, Murphy AJ, Robertson E, Sakurai T, Fukatsu A, Yancopoulos GD, Yanagita M. Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury. *Kidney Int* 2008; 73:181-191.
- 88) Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 199; 7:75-80.
- 89) Tapper EM, Hoover NW. Late results after meniscectomy. *J Bone Jt Surg Am* 1969; 51:517-526.
- 90) Tegner Y, Lysholm J. Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries. *Clin Orthop* 1985; 198:43-49.
- 91) Trieshmann HW, Jr. Knee arthroscopy: a cost analysis of general and local anesthesia. *Arthroscopy* 1996; 12:60-63.

- 92) Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88:753-759.
- 93) Verdonk R. Meniscal transplantation. *Acta Orthop Belg* 2002; 68:118-127.
- 94) Walsh CJ, Goodman D, Caplan AI, Goldberg VM. Meniscus regeneration in a partial meniscectomy model. *Tissue Eng* 1999; 5: 327-337.
- 95) Webber RJ, York JL, Vanderschelden JL, Hough Jr AJ. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med* 1989; 17:393-400.
- 96) Weigel, Nerlich, Praxisbuch Unfallchirurgie 2004.
- 97) Weis-Garcia F, Massagué J. Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF-beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity for signaling. *EMBO J* 1996; 15:276-289.
- 98) Wieser R, Wrana JL, Massagué J: GS domain mutations that constitutively activate TbetaR-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* 1995; 14:2199-2208.
- 99) Yamane S, Reddi AH. Induction of Chondrogenesis and Superficial Zone Protein Accumulation in Synovial Side Population Cells by BMP-7 and TGF- $\beta$ 1. *J Orthop Res* 2008; 26:485-492.
- 100) Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroen D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 1995; 130:217-226.
- 101) Yoon BS, Lyons KM. Multiple Functions of BMPs in Chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2004; 93:93-103.
- 102) Zeisberg EM, Tarnevski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen J, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine* 2007; 13(8):952-961.
- 103) Zellner J, Mueller M, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, Nerlich M, et al. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Res* 2010; 94(4):1150-1161.

- 104) Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of SMAD degradation and activity by Smurf2, and E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 974-979.
- 105) Zhang Z, Arnold JA, Williams T, et al. Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats. *Am J Sports Med* 1995;23:35-41.
- 106) Zhang ZN, Tu KY, Xu YK, et al. Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination. *Arthroscopy* 1988;4:151-159.
- 107) Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999; 400:687-693.
- 108) Zimmermann G, Müller U, Löffler C, Wentzensen A, Moghaddam A. Therapieerfolg bei atrophen Tibiaschaftfrakturen: Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) versus autologe Spongiosaplastik. *Unfallchirurg* 2007; 110:931-938.
- 109) Zou H, Wieser R, Massagué J, Niswander L. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes & Dev* 1997; 11:2191-2203.

## **7. ANHANG**

### **7.1 Lebenslauf**

08.01.1985            Als erstes Kind von Karin Schaffer, geb. Raab und Walter Schaffer  
                          in Regensburg geboren

1991-1995            Besuch der Grundschule Blaibach

1995-2004            Besuch des Benedikt-Stattler-Gymnasiums Bad Kötzting

2004-2010            Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

2006                  Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2010                  Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ab 01.01.2011        Assistenzarzt am Institut für radiologische Diagnostik,  
                          interventionelle Radiologie und Neuroradiologie des Klinikums  
                          Weidens

## **7.2 Danksagung**

Persönlicher und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Nerlich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, sowie für das stetige Interesse und die wertvolle Hilfestellung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenfalls besonderer Dank gilt Herrn. Dr. Dr. J.C. Roldán für die exzellente Kooperation, das stetige Interesse sowie die wertvollen Erfahrungen und Hilfen bezüglich des verwendeten Wachstumsfaktors, ohne welche die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Angele für seine stets freundliche Unterstützung, sein andauerndes Interesse an dem Projekt sowie seine wertvollen Erfahrungen auf dem Gebiet des Tissue Engineering.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. J. Zellner für die hervorragende Betreuung in allen Fragen und auftretenden Problemen des Projektes. Durch sein unermüdliches Engagement, seine Ideen, Erklärungen und Vorschläge wurde dieses Projekt erst durchführbar.

Bei Herrn Dr. R. Kujat möchte ich mich für die exzellente Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie seine unermüdliche Beantwortung aller technischer Fragen bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung für Unfallchirurgie am Klinikum der Universität Regensburg für ihre geduldige Unterstützung. Bei Frau D. Drenkard bedanke ich mich besonders für die andauernde Hilfe bei allen Problemen im Labor auch weit über ihre Dienstzeit hinaus.