

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

**Chondrogenes Potential autologer Meniskuszellen und
mesenchymaler Stammzellen in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Eva M. Kopetzky

aus Passau

2013

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

**Chondrogenes Potential von autologen Meniskuszellen
und mesenchymalen Stammzellen in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Eva M. Kopetzky

aus Passau

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Angele
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Helbig
Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG

- 1.1 Anatomie des Kniegelenks
- 1.2 Molekulare Grundlagen des Meniskus
- 1.3 Funktionelle Bedeutung der Menisken
- 1.4 Ätiologie von Meniskusläsionen und ihre Therapie
- 1.5 Weitere Therapiemöglichkeiten
- 1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

- 2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte
- 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien
- 2.1.3 Antikörper
- 2.1.4 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren
- 2.1.5 Stamm- und Gebrauchslösungen
- 2.1.6 Kits
- 2.1.7 Puffer und Lösungen
- 2.1.8 Medikamente
- 2.1.9 Tiere

2.2 Methoden

- 2.2.1 Zellkultur mesenchymaler Stammzellen von New Zealand White Rabbits
- 2.2.2 Meniskengewinnung und Zellkultur autologer Meniskuszellen von New Zealand White Rabbits
- 2.2.3 Herstellung der Zellaggregate
- 2.2.4 Entnahme der Zellaggregate
- 2.2.5 Analytik
 - 2.2.5.1 Fixierung
 - 2.2.5.2 Histologische Auswertung und Färbungen

- 2.2.5.3 Kollagen II - ELISA
- 2.2.5.4 Quantitative DNA-Analyse
- 2.2.6 Statistik

3 ERGEBNISSE

- 3.1 Makroskopische Ergebnisse
- 3.2 Histologische Ergebnisse
 - 3.2.1 DMMB-Färbung
 - 3.2.2 Kollagen II – Färbung
- 3.3 Pico Green DNA Assay
- 3.4 Kollagen II - ELISA

4 DISKUSSION

5 ZUSAMMENFASSUNG

6 LITERATUR

1 EINLEITUNG

Das Kniegelenk ist heute das operativ am häufigsten behandelte Gelenk⁹⁴.

Bei 15-30% der Sportverletzungen handelt es sich um Verletzungen des Kniegelenks. Knieverletzungen und hierunter vor allem Meniskusläsionen nehmen somit einen hohen Stellenwert in der Traumatologie ein⁴³.

Etwa die Hälfte aller Meniskusläsionen ist traumatisch bedingt, dabei stehen 40% der Verletzungen in Zusammenhang mit einer komplexen Knieverletzung, 8% sind reine Meniskusverletzungen, bei 52% entsteht die Meniskusläsion auf Grund bereits bestehender degenerativer Veränderungen⁴³.

Vor allem die Behandlung von Läsionen im avaskulären Bereich des Meniskus gestaltet sich, trotz stetigem Fortschritt in Medizin und Technik, bisher immer noch problematisch. Häufig ist die einzige mögliche Therapieoption avaskulärer Meniskusläsionen die partielle arthroskopische Menisektomie, welche jedoch einer präarthrotischen Veränderung entspricht und somit sekundär weitere Folgeerkrankungen nach sich ziehen kann. Jeder zweite Patient leidet 10 - 15 Jahre nach einer Menisektomie bereits an Gonarthrose¹¹⁸, wobei sich das Ausmaß arthrotischer Veränderungen direkt proportional zum Ausmaß der Meniskusresektion verhält²⁹.

Meniskusläsionen und die daraus resultierenden Folgeerkrankungen gehören zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten weltweit. Dementsprechend sind arthroskopische Eingriffe an Gelenkknorpel und Menisken mit 281 177 Eingriffen im Jahr 2010 die zweithäufigsten durchgeführten Operationen in Deutschland und haben somit auch eine große volkswirtschaftliche Bedeutung⁴⁹. Unter den vollstationären Patienten zählen Operationen an den Bewegungsorganen mit 28,1 % zu den meist erfolgten Eingriffen deutschlandweit⁵⁰.

Trotz entsprechender Therapie kommt es bei über 40% der Patienten mit Kniebinnenverletzung sekundär zur Entwicklung einer Arthrose⁶. Die daraus resultierenden Schmerzen und die zunehmende Bewegungseinschränkung bedingen häufig auch Arbeitseinschränkungen bzw. -ausfälle, folgende Rehabilitationsmaßnahmen sowie Frühberentungen und belasten dadurch zusätzlich das Gesundheitssystem⁵¹. Der suffizienteren Behandlung von avaskulären Meniskusläsionen kommt daher auch unter dem Aspekt der Vermeidung von Folgeschäden und -kosten eine große Bedeutung zu.

1.1 Anatomie des Kniegelenks

Das Kniegelenk als größtes menschliches Gelenk besitzt einen komplexen Aufbau. Es besteht aus 3 Teilgelenken: femoropatellares, mediales und laterales femorotibiales Kompartiment.

Die artikulierenden Gelenkflächen sind von hyalinem Gelenkknorpel überzogen, der durch Diffusion von der Synovialflüssigkeit ernährt wird.

Gelenkkapsel

Umgeben ist das Gelenk von einer Gelenkkapsel, die aus 2 funktionellen Schichten besteht: Membrana fibrosa und Membrana synovialis.

Die Membrana fibrosa ist besonders zugfest und sichert den Zusammenhalt des Gelenks. Sie wird durch zusätzliche Bänder, den sogenannten Ligamenta intracapsularia verstärkt. Zusätzlich ist sie mit dem Ligamentum patellae und Ligamentum collaterale tibiale verwachsen, die zu einer Stabilisierung beitragen.

Die Membrana synovialis besteht aus Fett- und Bindegewebe und enthält zahlreiche Blut- und Lymphgefäß. Die Oberfläche wird nicht von einem Epithel, sondern von Fibrozyten und Makrophagen gebildet. Zur Oberflächenvergrößerung ist die Synovialmembran in Falten gelegt und zusätzlich mit Zotten besetzt.

Die Synovialmembran resorbiert und sezerniert die Synovia, ein Transudat, das in seiner Zusammensetzung dem Blutserum ähnelt. Zusätzlich enthält sie 1-2% Glycosaminoglycane (Hyaluronsäure) zur besseren Gleitfähigkeit ⁸⁹.

Die Synovia spielt für die Ernährung der Gelenkknorpel und der avaskulären Anteile der Menisken eine zentrale Rolle.

Bandapparat

Der komplizierte Bandapparat des Kniegelenks dient der Stabilisierung und Führung des Kniegelenks.

Das Lig. cruciatum anterius läuft von der Area intercondylaris anterior der Tibia zur medialen Fläche des lateralen Femurkondylus. Das kräftigere Lig. cruciatum posterius zieht von der Area intercondylaris posterius zur lateralen Fläche des medialen Femurkondylus. Die beiden Kreuzbänder laufen in etwa rechtwinklig zueinander ¹²¹.

Das Innenband (Lig. collaterale tibiale) geht vom Epicondylus medialis des Femurs aus, inseriert an der medialen Seite der Tibia und ist fest mit der Gelenkkapsel verwachsen.

Das Lig. collaterale fibulare zieht vom Epicondylus lateralis zum Fibulaköpfchen und hat keinen Kontakt zur Gelenkkapsel.

In Streckstellung sind beide Kollateralbänder gespannt und stabilisieren das Knie in dieser Position. Mit zunehmender Beugung nimmt der Abstand zwischen Ursprung und Ansatz der Kollateralbänder ab. Die Bänder entspannen. Eine Rotation im Kniegelenk ist daher nur bei gebeugtem Knie und damit entspannten Seitenbändern möglich.

Menisken

Die Menisken liegen intraartikulär und zeigen in der Aufsicht einen halbmond-förmigen Bau (lat. meniscus = Halbmond). Der mediale Meniskus ist insgesamt ca. 3,5 cm lang. Er besitzt ein schmales Vorderhorn mit einer Breite von 8-9mm und ein breites Hinterhorn mit einer Breite von 13-17mm. Der laterale Meniskus ist fast ringförmig mit zwei gleich langen Hörnern (11-13mm) konfiguriert^{5,43,115}.

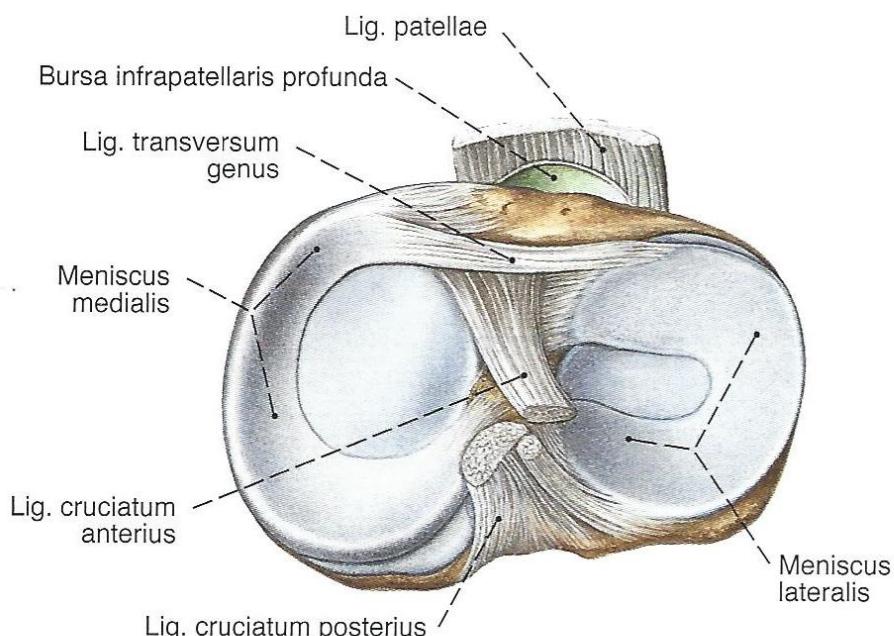


Abbildung 1.1: Kniegelenk und Menisken von proximal nach Durchtrennung der Gelenkkapsel und Kreuz- und Seitenbändern¹²⁹

Beide Menisken sind an Tibia (Lig. meniscotibiale) und Femur (Lig. meniscofemorale) verankert. Über das Ligamentum transversum genus sind die beiden Menisken auch untereinander fixiert⁴³.

Eine weitere Verankerung besteht über das Lig. meniscofemorale anterius (Humphry) und das Lig. meniscofemorale posterius (Wrisberg), die das Hinterhorn des Außenmeniskus mit dem medialen Femurkondylus verbinden.

Außerdem sind die Menisken über kurze Bänder in der Area intercondylaris verankert. Die Band-Verankerungen des Innenmeniskus liegen dabei weiter voneinander entfernt als die des Außenmeniskus. Zusätzlich ist der Innenmeniskus mit dem Lig. collaterale tibiale verwachsen und daher weniger beweglich als der Außenmeniskus¹²¹.

Der Außenmeniskus hingegen hat keinen Kontakt zum Ligamentum collaterale fibulare. Auf Grund dieser anatomischen Gegebenheiten ist der Innenmeniskus ca. dreimal häufiger verletzt als der Außenmeniskus^{43,45}.

1.2 Molekulare Grundlagen des Meniskus

Die Fibrochondrozyten des Meniskus sind von einem Knorpelhof (Lakune) umgeben und in die von ihnen gebildete extrazelluläre Matrix eingebettet.

Phänotypisch zeigen diese Meniskuszellen sowohl Eigenschaften von Fibroblasten als auch von Chondrozyten¹⁰⁵. Der Meniskus ist ein inhomogenes Gewebe, das signifikante Unterschiede in Zellzahl und Vaskularisierung, abhängig von der Entfernung vom peripheren Rand, aufweist^{61,100}.

Als fibrocartilaginäre Struktur besitzt der Meniskus Eigenschaften sowohl von fibrösem als auch von cartilaginärem Gewebe. Dabei entspricht der innere Anteil eher einer cartilaginären¹⁰⁴, der äußere eher einer fibrösen Region^{91,110,115}.

Die Menisken bestehen zu 70% aus Wasser. Das Meniskustrockengewicht besteht zu 60-95% aus Kollagen, von dem wiederum ca. 90% Kollagen I und nur etwa 1-2% aus Kollagen II, III, V, VI sind^{27,41,78,93}. Der Rest besteht aus Proteoglykanen, Matrix-Glykoproteinen und einem kleinen Anteil an Elastin.

Proteoglykane machen dabei weniger als 2-3% des Trockengewichtes aus^{22,44,68,77,93} und sind vorwiegend in der inneren Zone des Meniskus zu finden.

Faserknorpel ist immer mit straffem Bindegewebe vergesellschaftet, in das er übergeht⁷⁷. So bestehen die inneren zwei Dritteln der Menisken aus Faserknorpel, während das äußere Drittel aus straffem Bindegewebe besteht¹²¹.

Die an die Kapsel grenzende Meniskusbasis hat Verbindung zur Synovia und ist daher gut vaskularisiert. Sie wird über die Aa. articulares inferiores medialis und lateralis aus der Arteria poplitea versorgt^{89,121}. Diese Gefäße vereinigen sich an der Basis der Menisken zu einem perimeniskalen kapillären Plexus. Kleinere radiäre Äste versorgen ca. 20-30% der basisnahen Gesamtmasse des Innenmeniskus und 10-25% des Außenmeniskus. Die Meniskenzellen der avaskulären Zone werden, ebenso wie der Gelenkknorpel, rein durch Diffusion von Synovialflüssigkeit und die Kompressions- und Dekompressionsbewegungen des Kniegelenks ernährt^{11,12,24,25,121}.

Man unterscheidet daher 3 Zonen^{2,10-12,94,160}:

- die stärker vaskularisierte äußere Zone (rot-rote Zone).
- die mittlere Zone (rot-weiße Übergangszone).
- die avaskuläre Innenzone (weiß-weiße Zone).

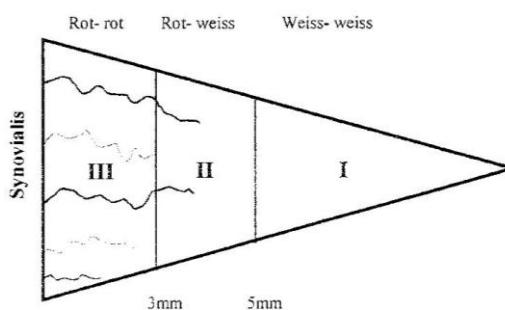


Abbildung 1.2.: Schematische Einteilung der Meniskusregionen.
III entspricht der gut vaskularisierten rot-roten Zone im Gegensatz zur nicht durchbluteten weiß-weißen Zone (I).
II stellt die intermediär gelegene rot-weiße Übergangszone dar⁹⁴.

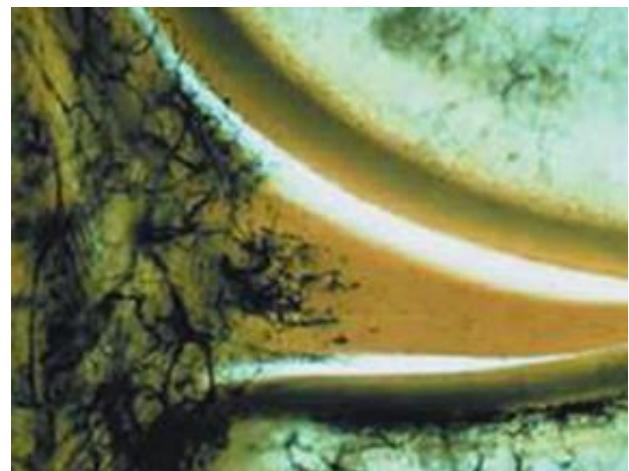


Abbildung 1.3.: Gefäßversorgung eines Meniskus. Nur das periphere, kapselnahe Drittel der Menisken ist mit Blutgefäßen versorgt².

Von großer Bedeutung ist auch die Anordnung der Kollagenfibrillen innerhalb des Meniskus, welche entlang der größten auf sie wirkenden Kräfte ausgerichtet sind^{21,110,125,137}. Entsprechend der Kollagenfaserarchitektur unterscheidet man drei Schichten. Die äußere, circa 10 µm dünne Schicht besteht aus einem diffusen Netzwerk aus feinen Fibrillen¹¹⁰. Darunter befindet sich eine etwa 150 µm dicke Schicht aus lamellenartig zusammengelagerten Fibrillen, die in der äußeren Zirkumferenz hauptsächlich radiär angeordnet sind, während sie sich in den inneren Anteilen netzartig überkreuzen^{84,110}. In der innenliegenden zentralen Hauptschicht, die den größten Teil des Meniskus ausmacht, sind die Kollagenfibrillen zirkulär angeordnet^{21,97,100,110,121,153} und nur vereinzelt von radiär ausgerichteten Fibrillen durchzogen. Durch ihre zirkuläre Anordnung halten sie Zug- und Ringspannungen stand und verteilen entstehende Druck- und Scherkräfte während der Kniebewegung und Gewichtsaufnahme^{21,91,93,125}.

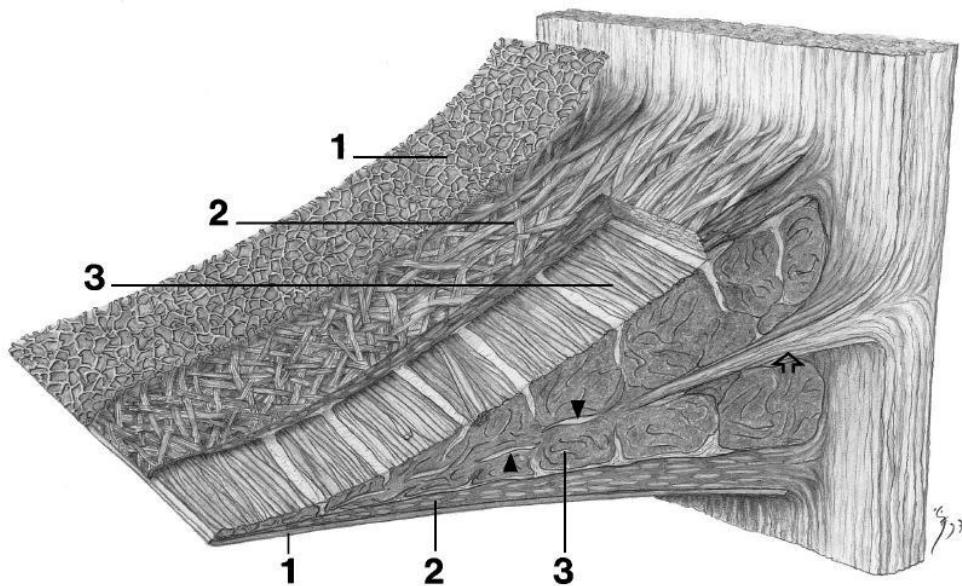


Abbildung 1.4.: Anordnung der Kollagenfibrillen im Meniskus.

(1) Oberflächliche Schicht aus einem Netzwerk feiner Fibrillen.

(2) Lamellenschicht aus lamellenartig angeordneten Kollagenfibrillen.

(3) Zentrale Hauptschicht aus zirkulär angeordneten Kollagenfaserbündeln. Vereinzelt auch radiär ausgerichtete Kollagenfibrillen (**Pfeilspitzen**). Lockeres Bindegewebe von der Gelenkkapsel inseriert zwischen zirkulär angeordneten Kollagenfaserbündeln (**Pfeil**).¹¹⁰

Die Kollagen I und III enthaltenden Fibrillen bilden komplexe makromolekulare Strukturen mit anderen extrazellulären Molekülen, wie Fibronectin und Laminin. Aber auch Kollagen II und Aggrecan sind Bestandteile des Meniskus^{27,41,93,100,119}.

Diese extrazellulären Moleküle bilden die funktionelle Struktur des Meniskus und haben somit wichtige biomechanische Bedeutung für das Knie^{44,100}.

1.3 Funktionelle Bedeutung der Menisken

Lange Zeit wurden die Menisken als funktionslose rudimentäre Komponenten des Kniegelenks angesehen. 1948 erkannte Fairbank als Erster, dass das Entfernen eines Meniskus radiologisch die Zeichen einer Arthrose, wie Verschmälerung des Gelenkspalts, Abflachung der Femurkondylen und Osteophytenbildung initiiert^{42,94}. Nach und nach wurde die Bedeutung der Menisken für das Kniegelenk klar.

Heute weiß man, dass den Menisken wichtige Aufgaben wie Gewichtsübertragung, Lastverteilung, Schockabsorption, Propriozeption, Formung kongruenter Gelenkflächen, Gelenkstabilisierung und Gelenklubrikation zukommen^{21,23,29,52,61,100,128} und eine Meniskektomie zu arthrotischen Veränderungen führt^{29,42,48,83,85,94,135}.

Lastverteilung: Jede Belastung, die auf das Kniegelenk einwirkt, wird von den Menisken und dem Gelenkknorpel gedämpft. Die Menisken verteilen die einwirkende Kraft auf eine größere Oberfläche. Ohne die Menisken würde es zu einer Spitzenbelastung in der Tibiaspitze kommen. Gleichzeitig erfolgt auf Grund der zirkulär angelegten Kollagenfasern¹²¹ eine Umverteilung von axialen Kräften in eine Ringspannung. So wird die auf den hyalinen Gelenkknorpel wirkende Kraft um 45-70% reduziert⁵. Durch Meniskusläsionen bzw. Meniskusteilresektionen verkleinert sich jedoch die Last aufnehmende Oberfläche, was zu einer Erhöhung der punktuellen Spitzendrücke und somit zu einer frühzeitigeren degenerativen Veränderung beiträgt⁵. Bereits eine Meniskusresektion von 18-34% führt zu einem Druckanstieg von bis zu 350%¹¹⁴.

Schockabsorption: Die Menisken besitzen auf Grund ihres oben beschriebenen anatomischen Aufbaus ausgeprägte viskoelastische Eigenschaften. Durch ihre

Verformbarkeit und die Anordnung der Kollagenfibrillen können sie Stoßkräfte gut absorbieren. So wird auch die während des Gehens auf das Kniegelenk einwirkende Stoßbelastung abgefangen.

Propriozeption: Cerulli et al. gelang als erster der Nachweis von sensiblen, nozizeptiven Wärme- und Druckrezeptoren. Die Menisken enthalten außerdem Vater-Pacini-Körper für die Tiefensensibilität. Das Vorder- und Hinterhorn enthält dabei mehr Propriozeptoren als der mittlere Meniskusanteil. Sie scheinen somit für die Koordination des Kniegelenkes von besonderer Bedeutung zu sein²⁶.

Kongruenz: Im Querschnitt sind die Menisken keilförmig. Dabei ist die dem Tibiaplateau aufliegende Seite des Meniskus plan, die dem Femur zugewandte Seite konkav. Somit schaffen die Menisken eine Art Gelenkpfanne, ermöglichen die Kongruenz und den Zusammenhalt zwischen den beiden artikulierenden Gelenkflächen, verhindern ein Abgleiten der Femurkondylen von den flachen Gelenkflächen der Tibia und wahren so den Zusammenhalt des Gelenks^{52,121,153}.

Stabilisierung: Der außergewöhnliche Bewegungsumfang des Kniegelenks von -10° Extension bis zu 160° Flexion erlaubt keine Knochenführung. Die Stabilität des Kniegelenks muss aber dennoch gewährleistet sein. Sie wird durch den komplizierten Bandapparat und die 2 Menisken gesichert. Die Menisken fungieren somit als sekundäre Stabilisatoren des Knies.

Um das Knie stark zu beugen (ca. 160°) müssen die Femurkondylen auf dem Tibiaplateau nach hinten gleiten. Mit den Femurkondylen gleiten auch die Menisken nach hinten und sichern dadurch auch dort die Kongruenz der Gelenkflächen. Außerdem verhindern sie in dieser Position ein Abgleiten der Femurkondylen vom Tibiaplateau. Der laterale Meniskus gleitet dabei stärker nach hinten als der mediale, der durch seine Fixation am Innenband einen geringeren Bewegungsumfang aufweist³².

Auch bei der Streckung spielt die Gleiteigenschaft der Menisken eine wichtige Rolle. Der laterale Femurkondylus gleitet bei der Streckung weiter nach vorne als der mediale. So kommt die Schlussrotation zustande. Diese Innenrotation des Femurs am Ende der Streckbewegung stabilisiert das Knie zusätzlich in dieser Position.

Durch den gespannten Kapsel-Band-Apparat und die Schlussrotation ist das Knie in voller Streckung äußerst stabil.

Lubrikation: Bei diesen Gleitbewegungen führen die Menisken Synovialflüssigkeit mit sich. Dadurch verbessert sich nicht nur die Gleitfähigkeit der Gelenkflächen, sondern dies führt auch zu einer Verbesserung der Knorpelnährung.

1.4 Ätiologie von Meniskusläsionen und ihre Therapie

Der Meniskus wird häufig durch sportliche Aktivitäten geschädigt. Dabei stellt die Rotation im Kniegelenk bei fixiertem Unterschenkel den häufigsten Verletzungsmechanismus dar^{32,102}. Durch die dabei wirkenden Scherkräfte kommt es zu einem Meniskusriss. Aber auch degenerative Veränderungen spielen eine große Rolle.

Plötzlich auftretende Schmerzen und eine Blockierung des Kniegelenks mit federnder Streckhemmung sind typische Symptome. Des Weiteren kann ein Kniegelenkerguss oder gegebenenfalls bei Verletzungen der vaskularisierten Zone auch ein Hämarthros auftreten^{32,36,102}.

Die klinische Untersuchung stellt dabei ein wichtiges Diagnoseinstrument dar und lässt oftmals bereits auf die Lokalisation der Meniskusverletzung schließen. Folgende klinische Tests finden bei der Untersuchung von Meniskusläsionen häufig Anwendung:

- Druckschmerz im Gelenkspalt: Druckschmerz über dem medialen oder lateralen Gelenkspalt kann auf eine Läsion des Innen- bzw. Außenmeniskus hinweisen.
- Böhler: Schmerzen bei Varus- bzw. Valgusstress bei gestrecktem Knie deutet auf eine Schädigung des Innen- bzw. Außenmeniskus hin.
- Steinmann I: Innen- bzw Außenrotation des Unterschenkels bei 30 ° gebeugtem Knie löst bei Vorliegen eines Meniskusschadens Schmerz aus.
- Steinmann II: Schmerzwanderung bei Kniebeugung von ventral nach dorsal.
- Payr-Zeichen: Varusstress im Schneidersitz weist vor allem auf eine Hinterhornläsion hin.

- Apley-Grinding Test: Schmerzhaftheit bei axialer Stauchung unter gleichzeitiger Innen- bzw. Außenrotation des Unterschenkels.

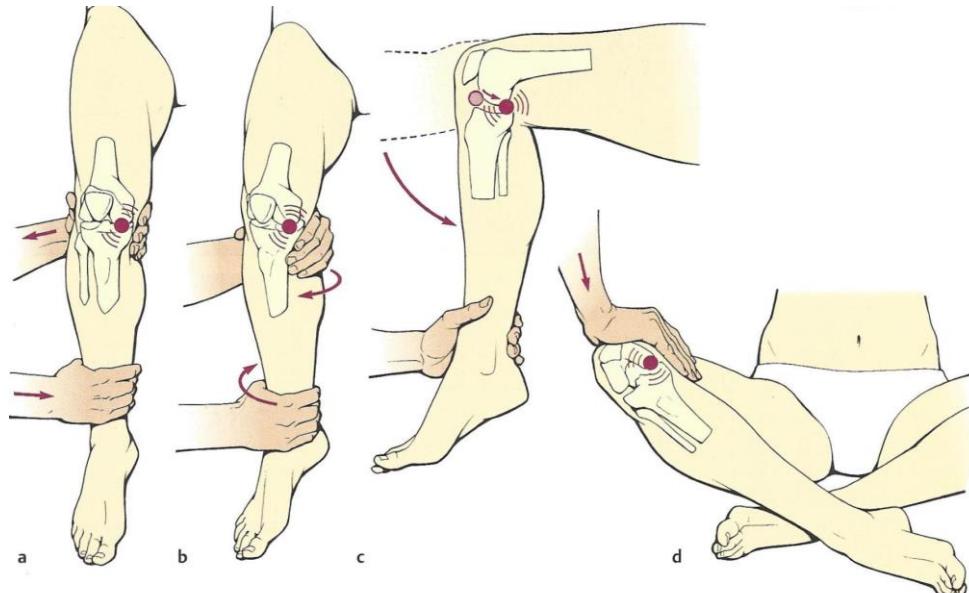
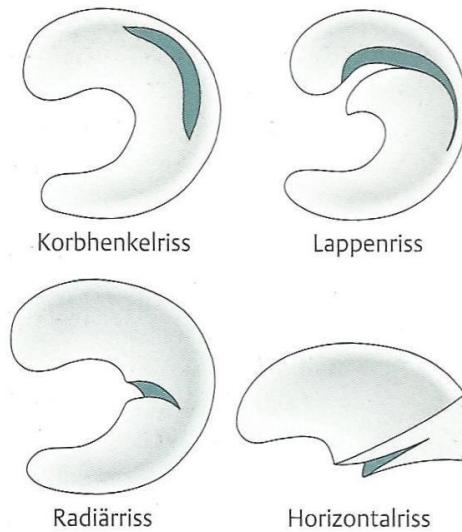


Abbildung 1.5: Meniskuszeichen. A: Böhler; B: Steinmann I; C: Steinmann II; D: Payr ¹⁰²

Neben den klinischen Tests ist die Kernspintomographie Mittel der Wahl zur Diagnosestellung von Meniskusläsionen. Mit einer Treffsicherheit von 90-98% ist die MRT ein gutes Diagnostikum ⁵. Nach Stoller können Meniskusläsionen anhand eines MRT in 4 Grade eingeteilt werden. In 36% der Fälle zeigen sich auch in symptomlosen Kniegelenken kernspintomographische Veränderungen. MRT-Befunde sollten daher immer von einer klinischen Untersuchung begleitet sein ⁵. Zur genaueren Diagnose kann zusätzlich auch die Arthroskopie explorativ verwendet werden. Die Menisken können hierbei gut eingesehen, beurteilt und gegebenenfalls im gleichen Schritt auch therapeutisch behandelt werden ⁹⁴.

Meniskusverletzungen können viele Formen haben. 1962 teilte Trillat die Meniskusläsionen nach ihrer Form ein. Er unterschied dabei Längs-, Horizontal-, Lappen- und Korbhenkelrisse ^{30,90,91,138}.

Abbildung 1.6.: Meniskusrisse¹⁵⁵

Rotationsbewegungen bei fixiertem Unterschenkel verursachen zirkuläre Spitzenbelastungen in den tiefen Schichten des Meniskus zwischen den kollagenen Faserbündeln. Dabei reißen die radiären Bündel und es kommt zum typischen Korbhenkelriss^{32,36,102}. Meist liegen diese Läsionen in der vaskularisierten Zone des Meniskus und stellen daher eine gute Indikation für eine Meniskusnaht dar³⁶. Läsionen in der rot-roten Zone und rot-weißen Zone sind für die Refixation mit Naht geeignet. Dabei finden vor allem die Outside-In- sowie die All-inside-Technik Anwendung^{75,94}.

Die Outside-in-Technik wird vor allem für Läsionen im Meniskuskörper, der Pars intermedia oder im Vorderhorn verwendet⁹⁴. Man verwendet dabei 2 Kanülen: über die eine wird der Faden mittels einer Schlinge eingebracht, durch die zweite Kanüle wieder aus dem Gelenk geführt und anschließend über eine Stichinzision auf der Gelenkkapsel vernäht. Bei der Outside-in-Technik können die Nadeln am lateralen und medialen Winkel des Kniegelenks genau geführt werden, allerdings kann es bei dieser Technik zu einer Verschiebung des Meniskusfragments kommen³⁶. Diese Technik ist insgesamt die stabilste Nahttechnik und zudem die kostengünstigste Variante. Sie setzt allerdings eine hohe operative Geschicklichkeit voraus⁹⁴.

Die All-inside-Nahttechnik wird in erster Linie für Risse im Hinterhornbereich oder Radiärrisse verwendet. Nachteil dieser Operationstechnik ist das dazu benötigte Spezialinstrumentarium.

Auf Grund des Verlaufs der Faserbündel im Meniskus sollten horizontale Nähte gemacht werden. Da dies jedoch nicht immer möglich ist, können gegebenfalls auch vertikale Nähte angelegt werden.

Der Erfolg der Meniskusnaht wird in der Literatur in unterschiedlichen Studien zwischen 63% - 91% angegeben^{33,79}. Allerdings ist der Erfolg der Meniskusnähte auch stark von der Stabilität des Knies abhängig. So zeigte DeHaven in einer Langzeit-Studie, dass in instabilen Gelenken nur noch 54% der genähten Menisken intakt waren, während es in stabilen Kniegelenken über 95% waren⁹⁴.

Eine weitere Möglichkeit der Refixation ist, neben der Meniskusnaht, die Verwendung von biodegradablen Implantaten in Form von Schrauben oder Dübeln. Diese weisen jedoch eine höhere Tendenz zur Dislokation auf und die Resorption des Materials ist auf Grund ihrer Massivität oftmals verlängert. Die prominenten Kopfteile der eingebrachten Implantate führen zudem häufig zu Knorpelläsionen. Außerdem sind diese Implantate derzeit noch mit einem hohen Kostenfaktor verbunden⁹⁴.

Nicht alle Risse können gewebeerhaltend behandelt werden. Partielle Resektionen sind häufiger als Meniskusreparaturen^{91,115}.

Lappenrisse beispielsweise, die durch ein Kompressions- und Torsionstrauma entstehen und oft lange symptomlos bleiben, bedürfen auf Grund ihrer Lokalisation im avaskulären Bereich des Meniskus einer Meniskusteilresektion³⁶. Häufigste Lokalisation von LappenrisSEN ist dabei der mediale und dorsale Bereich des Innenmeniskus.

Da die Gonarthroserate mit der Menge des resezierten Meniskus steigt, gilt die Regel: so viel wie nötig, aber so wenig wie möglich. Der Meniskuswall sollte erhalten bleiben. Es muss sparsam und Knorpel erhaltend reseziert werden, um die Biomechanik des Kniegelenks so wenig wie möglich zu verändern^{29,32,114,118}.

Mikrotraumen werden durch Überbelastungen des Meniskus verursacht. Sie treten häufiger in den dorsalen und dorsomedialen Hörnern auf, die mechanisch stärkeren

Belastungen ausgesetzt sind³⁶. So ist auch der mediale Meniskus häufiger betroffen als der laterale⁷⁹.

Nach Meniskektomie kommt es zu einer Verringerung der tibio-femoralen Kontaktfläche und damit zu einer Erhöhung der Spitzendruckbelastung auf den darunter liegenden Gelenkknorpel um bis zu 350%^{3,5,17,83,91,94,115}. Die Biomechanik des Kniegelenks wird dadurch verändert^{85,88}.

In mehreren Versuchen an Tiermodellen^{38,67,87} zeigte sich, dass eine Meniskektomie zur Einschränkung der mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels führt und damit sekundär zu degenerativen Veränderungen, wie Osteophytenbildung und Gelenkspaltverschmälerung^{91,111,115}.

Weitere Studien haben gezeigt, dass die degenerative Gelenkerkrankung mit Symptomen wie Gelenkinstabilität, Erosion des Gelenkknorpels, Osteophytenbildung und Voranschreiten der Arthrose nach totaler Meniskektomie deutlich zunimmt. Auch eine Meniskusteilresektion führt, wenn auch meist in geringerem Maße, zu degenerativen Veränderungen, wobei die Gonarthroserate direkt mit dem Ausmaß der Meniskusresektion korreliert^{25,29,39,42,48,61,100,135}.

1.5 Weitere Therapiemöglichkeiten

Ein Riss in der äußeren vaskulären Zone des Meniskus kann unter Erhalt der Meniskusfunktion gut therapiert werden⁶⁴.

Trotz der fortschreitenden Technik auf dem Gebiet der Meniskusoperationen, kann jedoch nicht jede Läsion meniskuserhaltend therapiert werden.

Läsionen des zentralen avaskulären Drittels heilen nicht spontan. Es muss daher eine operative Teilresektion durchgeführt werden, um die Kniestomatik zu verbessern. Resektionen führen zu degenerativer Gelenkerkrankung, gestörter Biomechanik, Instabilität und vorzeitiger Arthrose und in diesen Zusammenhängen zu zunehmendem Belastungsschmerz. Es besteht daher großes Interesse an der Erhaltung der Menisken und ihrer biomechanischen Funktion im Kniegelenk^{5,61,63,100,131}.

Viele Therapieansätze sind bereits in der Literatur beschrieben, wie beispielsweise die Verbesserung operativer Ergebnisse mit Fibrin-Clots^{65,66,100,111,153}.

Die unterschiedlichen Heilungstendenzen von Rissen der äußeren und inneren Zone sowie die beobachteten Unterschiede in der Vaskularisierung der Zonen lassen vermuten, dass die Vaskularisierung essentiell für die Heilung von Meniskusläsionen ist.

King war 1936 der Erste, der vermutete, dass Risse, die eine Verbindung zur vaskulären Peripherie haben, spontan heilen, während Läsionen die auf die innere avaskuläre Region beschränkt sind, nicht heilen¹¹¹.

So wurden chirurgische Techniken entwickelt, in denen man versuchte, die Vaskularisierung der äußeren Zone zu nutzen, indem man eine Verbindung zwischen der avaskulären Meniskusläsion und dem vaskulären Teil des Meniskus herstellte und somit der avaskulären Zone Zugang zur Blutversorgung ermöglichte¹². Beispiel hierfür ist die Verwendung von vaskulären Kanälen zwischen Synovia und avaskulärer Zone^{5,10,13,91,153}, die jedoch nicht die erhofften Erfolge erzielten. Auch Techniken wie synovial abrasio, meniscus rasping und synovial flap implantation zeigten keine zufriedenstellenden Ergebnisse^{15,25,47,61,64,94,145}.

Einen weiteren Ansatz stellte die Verwendung von vascular endothelial growth factor (VEGF) dar. Durch die lokale Applikation von vascular endothelial growth factor in Form von VEGF-ummanteltem Fadenmaterial erhoffte man sich eine Verbesserung der Vaskularisation. Doch auch diese Therapie erzielte nur unzureichende Erfolge^{80,108,109}.

Eine weitere Therapieoption stellen Meniskustransplantationen mit Allografts oder Sehnen dar^{1,14,15,53,54,62,76,100,130,141,143}. Bei der Meniskustransplantation unterscheidet man die autogene und allogene Meniskustransplantation.

Bei der autogenen Transplantation wird körpereigenes Ersatzgewebe zur Rekonstruktion der fehlenden Menisken in das Knie eingebracht. Verwendet wurden dafür bisher Sehnentransplantate und Material aus dem Hoffa-Fettkörper.

Die Sehnentransplantate zeigten aber nur in sehr geringem Ausmaß eine Umwandlung zu meniskusähnlichem Gewebe und sind daher für die Therapie wenig geeignet^{53,54}. Entgegen früherer Angaben eignet sich auch der Hoffa'sche Fettkörper nicht zur Rekonstruktion⁵.

Bei der allogenen Meniskustransplantation handelt es sich um eine Transplantation von Spendermenisken, die tiefgefroren in Gewebebanken eingelagert. Etwa 6-8 Wochen nach Einbringen der Transplantate kommt es zum Einwachsen von Empfängerzellen in das Transplantat^{126,143}. Auch konnte bei der Mehrheit der Patienten durch diese Methode eine Schmerzlinderung erzielt werden⁶⁹. Allerdings hängt der Erfolg dieser Methode sehr stark von dem Grad der Vorschädigung des Kniegelenks und seiner Stabilität ab. Dienst et al zeigten, dass bei entsprechender Indikationsstellung Erfolgsraten von 70-80% nach 3-7 Jahren erzielt werden können^{35,69}.

Nachteile sind die Abstoßungsreaktion des Empfängers, die eingeschränkte Verfügbarkeit, Infektionen und die Schrumpfung der eingebrachten Transplantate^{5,15,25,47,151}.

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Meniskusersatzmaterialien wie Actifit (Polyurethan)^{37,142} und Menaflex (kollagenes Meniskusimplantat)^{55,95,116}, ein Kollagengerüst, das aus der Achillessehne von Rindern gewonnen wird. Erste Studien zeigen, dass es sowohl bei der Verwendung von Actifit, ebenso wie bei der Implantation von Menaflex, zur Einwanderung von Empfängerzellen kommt und das Polyurethan- bzw. Kollagengerüst von meniskusähnlichem Gewebe ersetzt wird^{92,116,136,144}. Inwiefern diese Gewebe aber den biomechanischen Ansprüchen des Kniegelenks gerecht werden und welchen Nutzen Patienten aus dieser Therapieform ziehen, ist noch unklar, da bisher noch keine Langzeitergebnisse vorliegen^{5,142}.

Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen stellt eine vielversprechende Alternative dar^{9,70,81,100,117,132}.

Vor der Entdeckung des Potentials der mesenchymalen Stammzellen war Knochenmark in erster Linie als Quelle von Knochenzellen (Osteozyten) und Bildner von Knochengewebe bekannt. Anschließend entdeckte man ihren Einfluss auf die Hämatopoiese^{34,46}. Bald wurde ihr multiples Potential klar. Man entdeckte ihre Fähigkeit zur Differenzierung zu Adipozyten²⁰, Chondrozyten¹⁵⁷ und anschließend auch zu einer Reihe weiterer Phänotypen^{25,56,74,120,154}.

Es liegt nahe dieses Differenzierungspotential auch zur Therapie von Meniskusläsionen zu nutzen. Im Tiermodell konnten dabei bereits gute Ergebnisse erzielt werden.

So konnten Angele et al. bei der Behandlung von kombiniert vaskulär-avaskulären Meniskusläsionen im Kaninchenmodell mittels Tissue-Engineering mit mesenchymalen Stammzellen Erfolge verzeichnen^{7,8}.

Zellner et al. zeigten weiter, dass Tissue-Engineering mit mesenchymalen Stammzellen auch bei rein avaskulären Meniskusläsionen erfolgreich angewendet werden kann¹⁵⁹.

Neben mesenchymalen Stammzellen können auch die organspezifischen autologen Meniskuszellen als Zellresource des Tissue Engineering verwendet werden. Peretti et al. beispielsweise konnten erfolgreich die Transplantation von autologen Meniskuszellen und damit einen Benefit für die Regeneration von Meniskusläsionen zeigen¹⁰⁷.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Trotz fortschreitender Technik und intensiver Forschung im Bereich der Meniskusregeneration ist es bisher noch nicht gelungen avaskuläre Meniskusläsionen zufriedenstellend zu therapieren. Die Häufigkeit von Kniebinnenverletzungen und degenerativen Veränderungen und der damit verbundene enorme Kostenaufwand drängen zu weiterer Forschung und einer verbesserten Therapielösung.

Die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit der Menisken wird bisher in erster Linie der unterschiedlichen Vaskularisation der äußeren und inneren Anteile zugesprochen. So werden die peripheren Anteile des Meniskus über Äste aus der Arteria poplitea versorgt, während die inneren Anteile keinen Kontakt zur Blutversorgung haben und ausschließlich über die Synovialflüssigkeit ernährt werden. Einige Studien lassen jedoch vermuten, dass die unterschiedliche Heilungstendenz der inneren und äußeren Zone nicht ausschließlich von der unterschiedlichen Vaskularisation der Bereiche abhängig ist, sondern auch biologische Unterschiede zwischen den Meniskuszellen des inneren und äußeren Bereichs eine Rolle spielen.

So zeigt die äußere Zone eine höhere Proliferationsrate und eine vermehrte Expression von platelet-derived-growth-factor-AB. Außerdem zeigte sich, dass die

äußerer Anteile im Kaninchen Meniskus mehr Kollagen II produzieren. Die inneren Anteile produzieren deutlich mehr Aggrecan und Kollagen II-mRNA⁶¹.

Zudem bestehen strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Zonen. Die äußere Zone beinhaltet mehr große Kollagen I-Bündel, während die innere Zone mehr Kollagen II und Proteoglykane enthält⁶¹.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Unterschiede im chondrogenen Potential von Zellen der vaskulären und avaskulären Zone des Meniskus weiter untersucht werden. Des Weiteren soll das chondogene Potential von mesenchymalen Stammzellen und autologen Meniskuszellen *in vitro* verglichen werden.

Es sollen folgende Hypothesen geprüft werden:

Hypothese 1: Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich des Meniskus haben ein höheres chondrogenes Potential als Zellen aus dem avaskulären Bereich.

Hypothese 2: Meniskuszellen als gewebsspezifische Zellen haben ein ähnliches chondrogenes Potential wie mesenchymale Stammzellen.

2 MATERIAL UND METHODEN2.1 Material2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

| | |
|--|---------------------------------|
| Autoklav Melatronic 23 | Melag, Berlin |
| Brutschrank CO ₂ Heracell 240 | Heraeus, Hanau |
| Digitalfotokamera Polaroid DMC 3 | Polaroid, Dreieich-Sprendlingen |
| Deckgläser (24x24mm) | Roth, Karlsruhe |
| FACS, Kalibur | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Kanülen (18, 20, 27G) | BD Falcon, Heidelberg |
| Kryoröhrchen | Nalge-Nunc, Rochester, NY, USA |
| Kryostat HM 500 OM | Microm, Berlin |
| Mikroskope: Dialux 20 EB | Leitz, Wetzlar |
| Mikroskopkamera DMC 2 | Polaroid, Offenbach |
| Mikrotiterplatten 96 Well | TPP, Schweiz |
| Milli Q – Biocel | Millipore, Molsheim, France |
| Multipette plus | Eppendorf, Hamburg |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Giessen |
| Objektträger; Starfrost adhäsiv | Knittel, Braunschweig |
| Pipetboy acu | IBS Integra Biosciences |
| Pipetten, Costar Stripette (1/5/10/25/50 ml) | Corning, Corning, NY, USA |
| Pipetten (10/100/1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen epTips filter (10/100/250/1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Polypropylenröhrchen (15/50ml) | Becton, Heidelberg |

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| Präzisionswaage BP 221 S | Sartorius, Göttingen |
| Reaktionsgefäße (1,5/2ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Schüttler IKA-Vibrax-VXR | IKA Labortechnik, Staufen |
| Skalpelle Nr. 11 | Feather, Köln |
| Spritzen (5, 10ml) | BD Falcon, Heidelberg |
| Sterilfilter 0,2 µm | Sartorius, Göttingen |
| Vortex Genie 2 | Roth, Karlsruhe |
| Waage EG 600-2M | Kern, Balingen-Frommern |
| Wasserbad | Julabo, Seelbach |
| Wasserbad WB 10 | Memmert, Schwabach |
| Sterile Werkbank Herasafe | Heraeus, Hanau |
| Zellkulturflaschen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zentrifugen: Multifuge 3S | Heraeus, Hanau |
| Centrifuge 5415 R | Eppendorf, Hamburg |

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|------------------------------------|---------------------------|
| Albumin, bovine (BSA) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Citronensäuremonohydrat | Merck, Darmstadt |
| Collagenase 2, dialysed, sterile | PAA, Pasching, Österreich |
| Dexamethason | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Diaminobenzidine 3,3` (DAB) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Dikaliumhydrogenphosphatetrihydrat | Merck, Darmstadt |
| DePex | Serva, Heidelberg |
| 1,9-Dimethyl-Methylen Blau (DMMB) | Sigma Aldrich, Steinheim |

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Formalinlösung 37% | Merck, Darmstadt |
| Gelatine, Schwein | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Glutardialdehyd 25% | Roth, Karlsruhe |
| HCl (konz.) | Merck, Darmstadt |
| H ₂ O ₂ | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Kalziumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumcitrat | Merck, Darmstadt |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat | Merck, Darmstadt |
| Nickelchlorid | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Paraformaldehyd | Riedel, Seelze |
| Pepsin | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Phenylhydrazin | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Propanol | Merck, Darmstadt |
| Saccharose, D+ | Roth, Karlsruhe |
| Sodiumpyruvat | Gibco, Karlsruhe |
| Tissue-Tek | Sakura, Zoeterwoude, NL |
| Tris-Puffer | Roth, Karlsruhe |
| Triton X – 100 | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Trypsin 1% EDTA | Gibco, Karlsruhe |

Xylol

Merck, Darmstadt

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

2.1.3 Antikörper

Anti-Collagen Type II Mouse IgG

Calbiochem, Darmstadt

Klon: II-4C11

Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti Dianova, Hamburg

Mouse IgG

Die primären Antikörper wiesen eine bekannte Kreuzreaktion gegen Rabbit auf.

2.1.4 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren

Ascorbic acid-2 phosphate

Sigma Aldrich, Steinheim

Fetal Bovine Serum, (FCS)

PAN Biotech, Aldenbach

Dexamethason

Sigma Aldrich, Steinheim

Dulbecco's Modified Eagle Medium

Gibco, Karlsruhe

(DMEM) high glucose

Dulbecco's Modified Eagle Medium

Gibco, Karlsruhe

(DMEM) low glucose

Goat Serum

DakoCytomation, Dänemark

Hepes buffer

Gibco, Karlsruhe

ITS + 3

Sigma Aldrich, Steinheim

Penicillin/Streptomycin

Gibco, Karlsruhe

| | |
|--|------------------------|
| RPMI 1640 mit Phenolrot | Gibco, Karlsruhe |
| Sodium-Pyruvat | Gibco, Karlsruhe |
| Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) | R&D Systems, Wiesbaden |

Kulturmedium für mesenchymale Stammzellen:

Low Glucose DMEM (1 g/l),
10% FCS nicht hitzeinaktiviert,
Hepes Puffer 1%,
PenStrep 1% (Lösung).

Kulturmedium für autologe Meniskuszellen:

RPMI 1640,
10% FCS nicht hitzeinaktiviert,
1% Hepes-Puffer,
1% PenStrep

Chondrogenes Differenzierungsmedium:

High Glucose DMEM (4,5 g/l),
1% Sodium- Pyruvat (Stammlösung),
1% ITS +3 (Lösung),
Dexamethason 100nM,
TGF β 1 recombinant 10ng/ml,
Ascorbinsäure Phosphat 200 μ M (37,5 μ g/ml)

2.1.5 Stamm- und Gebrauchslösungen

L-Ascorbic Acid-2-Phosphat

0,1024g Ascorbinsäure,
20ml Tyrodes Lsg

Dexamethason (Stock)

0,00392g Dexamethason in 10ml 100% Ethanol

Dexamethason (Gebrauch)

200µl Stocklösung,
19,8ml DMEM Low Glucose

TGF β 1

TGF (2µg/ml)
+ BSA (0,1%)
in HCl (4mM)

2.1.6 Kits

ABC – Kit Vector, Burlingame, CA, USA

Native Type II Collagen Detection Kit Chondrex, Redmond, WA, USA

Quant iT Pico Green dsDNA Reagent and Kits Invitrogen, Paisley, UK

2.1.7 Puffer und Lösungen

Blockingpuffer für Immunhistochemie

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

DAB Stammlösung 10X

0,5% Diaminobenzidin in 0,1% BSA

DAB Arbeitslösung

200 μ l DAB/BSA,
1800 μ l 0,1M mPBS,
80 μ l Ni/Co (Stammlösung),
6 μ l 6% H₂O₂ (direkt vor Verwendung)

DMMB-Färbelösung, 0,1%

99,9 g Aqua dest.
0,1 g DMMB

Fixierlösung (Standard-Fixans)

4% Formaldehyd
0,1M Phosphatpuffer
teilweise + 0,5% Glutardialdehyd (siehe Methoden)

Gelatine-Lösung für Objektträgerbeschriftung

Lösen von 0,5g Chromalaun in 5 ml Aqua dest.
Gelatine in 45ml Aqua dest. einige Minuten quellen lassen
anschließend Erhitzen bis Gelatine aufgelöst ist
Erkalten lassen
Zugabe von Chromalaun-Lösung und 125 μ l Glutardialdehyd

McIlvaine-Puffer

67,8ml 0,1 M Citronensäure
32,2ml 0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Ni/Co Lösung (für DAB Arbeitslösung)

100mg NiCl₂,
5mg CoCl₂,
10mg BSA,
10ml H₂O

m-PBS- Puffer (1M)

47,2g K₂HPO₄ x 3H₂O,
6,6g NaH₂PO₄, H₂O,
36,0g NaCl mit a.d. auf 500g auffüllen,
pH zwischen 7,0 und 7,4

PBS

150mM NaCl,
8mM K₂HPO₄,
2mM KH₂PO₄,
pH 7,3

Pepsinlösung 0,1%

1mg Pepsin in 1ml McIlvaine-Puffer (0,1M Zitronensäure, 0,2M Dinatriumhydrogenphosphat bei pH 3,6)

Phenylhydrazin-Lösung

200ml Waschpuffer ohne Triton,
4 mg Phenylhydrazin (Lösung 1),
100ml von Lösung 1 mit 30µl H₂O₂ 6% (Lösung 2)

Phosphatpuffer 0,2M

Dinatriumhydrogenphosphat 5Teile,
Natriumdihydrogenphosphat 1Teil
pH 7,4

TBS-Puffer (10x)

1,0M Tris-Puffer
2,0M NaCl
50 mM CaCl₂
pH mit NaOH 1N auf 7,8 - 8,0 einstellen

Trispuffer 0,2M

24,228g Tris,

1000ml Aqua dest.
mit HCl 0,2N auf pH 7 eingestellt

Tris – Waschpuffer für Immunhistochemie

780ml Tris 0,2M,
2220ml Aqua.dest.,
24,96g NaCl,
1200µl Triton 4%
Gesamt 3000ml

Verdaulösung für zerkleinerte Menisken

RPMI 1640 2Teile,
Collagenase2 1Teil

2.1.8 Medikamente

| | |
|------------------------------------|------------------------|
| Heparin (Liquemin) | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Ketamin 10% | WDT, Garbsen |
| Natriumchlorid-Lösung, isoton 0,9% | Braun, Melsungen |
| Pentobarbital (Narcoren) | Merial, Hallbergmoos |
| Povidon Jod (Betaisodona Salbe) | Mundipharma, Limburg |
| Xylazin 2% | CP Pharma, Burgdorf |

2.1.9 Tiere

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

Die Tiere wurden im Tierstall des Klinikums der Universität Regensburg gehalten.
Freier Zugang zu Nahrung und Wasser war jederzeit gewährleistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur mesenchymaler Stammzellen von New Zealand White Rabbits

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Universitätsklinik Regensburg wurde Knochenmark zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen von New Zealand White Rabbits entnommen. Die hierfür erforderliche Narkose erfolgte mit einer Mixture von 0,6 ml/kg aus Ketamin 10% (2,5ml) und Xylazin 2% (2,5ml).

Nach Positionierung der Kaninchen in Bauchlage und sterilem Abdecken wurde die Haut beidseits über dem Beckenkamm auf ca. 1-2 cm Länge inzidiert und dieser nach Spalten der Faszie dargestellt. Die Knochenmarkhöhle wurde mit einer 16-Gauge-Nadel eröffnet und das Knochenmark (ca. 4 ml) in eine heparinisierte Spritze aspiriert.

Anschließend erfolgte die sofortige Kultivierung. Nach Zugabe von Expansionsmedium, welches sich aus DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium), 10% FBS (fetales Rinderserum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Hepes Puffer zusammensetzte, wurde die Zentrifugation für fünf Minuten bei 1700 rpm durchgeführt. Nach Absaugen des Überstandes bis auf 10 ml erfolgte die Resuspendierung der Zellen. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurde anschließend die Zellzahl ermittelt. Diese errechnete sich aus der Formel:

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

wobei Z die gezählte Zellzahl, X den Verdünnungsfaktor und die Zahl 10^4 den Kammerfaktor darstellen. Anschließend wurden die Zellen auf eine 25 cm² Kulturflasche ausgebracht. Pro Kulturflasche wurden ca. 20 Millionen Zellen aufgetragen und mit 15 ml des oben genannten Expansionsmediums versetzt.

Danach erfolgte die Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, wasserdampfgesättigt) bis zur Konfluenz. Diese wurde bei zweimaligem Mediumwechsel pro Woche nach circa vier bis fünf Wochen erzielt.

2.2.2 Meniskengewinnung und Zellkultur autologer Meniskuszellen von New Zealand White Rabbits

Die Meniskengewinnung erfolgte ausschließlich von Tieren, die auf Grund anderer Versuchsvorhaben zu diesem Zeitpunkt geopfert werden mussten. Dazu wurden die Kaninchen nach obengenannter Anästhesie über einen peripheren Zugang (Ohrvene) mit einer intravenös applizierten Überdosierung von Pentobarbital (Narcoren) getötet.

Danach erfolgte die sterile Explantation der Menisken nach Querdurchtrennung der Patellarsehne, der Kapselstrukturen, sowie der Kollateral- und Kreuzbänder.

Anschließend wurden die Menisken in steriler Kochsalz-Lösung ins Labor transportiert und dort umgehend weiterbearbeitet. Zunächst wurden die Menisken mit reinem RPMI gewaschen und nach folgendem Schema in einen vaskulären und einen avaskulären Teil getrennt.

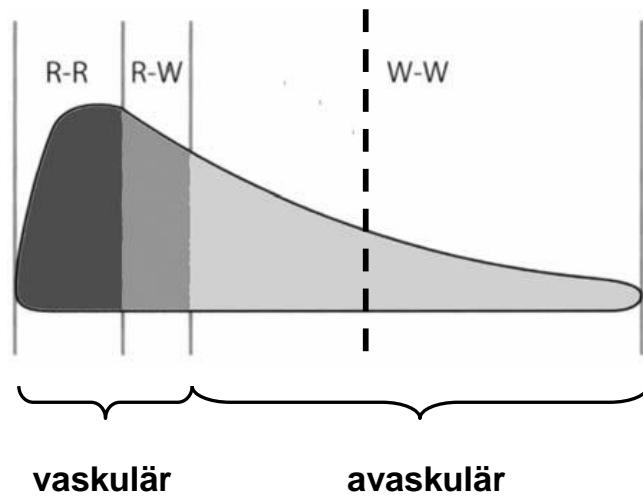


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des Meniskus im Querschnitt. R-R: rot-rote vaskularisierte Zone, R-W: rot-weiße Übergangszone, W-W: weiß-weiße avaskuläre Zone. Gestrichelte Linie: im Versuch angewendete Trennungslinie (frei nach ⁹⁴)

Somit wurde sichergestellt, dass der avaskuläre Teil aus reinem avaskulären Meniskus besteht.

Die vaskulären und avaskulären Teile des Meniskus wurden getrennt voneinander mit einem Skalpell zerkleinert, bis eine homogene zähe Masse entstand. Die sich entsprechenden Abschnitte der Innen- und Außenmenisken wurden dabei

zusammengefügt (avaskulärer Teil des Außenmeniskus und avaskulärer Teil des Innenmeniskus; vaskuläre Teile ebenso).

Anschließend wurden die Massen in je ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und eine entsprechende Menge Verdaulösung zugegeben: 6 ml für den avaskulären Teil, 10 ml für den vaskulären Teil. Die Falcons wurden über Nacht in den Schüttler gestellt.

Nach dem circa 20-stündigen Verdau wurde das Suspensat in ein 50 ml Falcon überführt. Durch Zugabe von 40 ml Meniskuszellkulturmedium wurde der Verdau gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren mit 1000 rpm für fünf Minuten wurde der Überstand anschließend auf 5 ml abgesaugt und mit 10 ml Meniskuszellkulturmedium resuspendiert. Die 15 ml wurden dann in eine Kulturflasche pipettiert und in einem Brutschrank (37°C, 5% CO₂, wasserdampfgesättigt) kultiviert. Bei regelmäßigerem Mediumwechsel zweimal wöchentlich erreichten sie die Konfluenz nach circa fünf Wochen.

2.2.3 Herstellung der Zellaggregate

Aus kultivierten mesenchymalen Stammzellen und den aus der vaskulären und avaskulären Zone der Kaninchenmenisken gewonnenen Meniskuszellen wurden Zellaggregate hergestellt.

Zu diesem Zweck wurde, wie oben beschrieben, nach Erreichen der Konfluenz zunächst das Medium in den Kulturflaschen abgesaugt und mit 5 ml PBS gespült, um das restliche Zellkulturmedium zu entfernen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 3 ml Trypsin unter mikroskopischer Kontrolle vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Trypsinierung wurde nach ca. drei Minuten mit Meniskuszellkulturmedium bzw. Stammzellkulturmedium gestoppt. Anschließend erfolgte die Überführung des Suspensats in ein 15 ml Falcon-Röhrchen.

Nach Zentrifugation der Zellen mit 1000 rpm für fünf Minuten wurde der Überstand komplett abgesaugt. Der so entstandene Rückstand wurde nun in chondrogenem Differenzierungsmedium (High Glucose DMEM (4,5 g/l), Sodium- Pyruvat, ITS +3,

Dexamethason, TGF β 1 recombinant, Ascorbinsäure Phosphat) aufgelöst und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Anschließend wurde die Zellsuspension auf einer 96-well-Platte verteilt, so dass die Zellzahl pro Well jeweils circa 200 000 betrug.

Nach erneuter Zentrifugation der Zellsuspensionen auf der 96-well-Platte wurden diese bei 37° kultiviert. Nach 24 Stunden bildete sich jeweils ein zum Röhrchen nicht adhärentes dreidimensionales Aggregat aus. Der Mediumwechsel erfolgte mit oben genanntem chondrogenen Differenzierungsmedium dreimal pro Woche für 21 Tage.

2.2.4 Entnahme der Zellaggregate

An Tag 1 und Tag 21 wurden pro Zellreihe je zwei bis drei Aggregate entnommen und der Histologie zugeführt. Zusätzlich wurden die Aggregate der Stammzellreihe an Tag 7 und Tag 14 untersucht. Dazu wurden die Aggregate mit einem sterilen Spatel entnommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und anschließend fixiert.

An Tag 1 und 21 wurden außerdem weitere vier Aggregate pro Zellreihe für den Kollagen II – Nachweis mittels ELISA entnommen. Diese wurden ebenfalls steril in ein Eppendorf-Cup überführt und umgehend in flüssigem Stickstoff bei – 80° asserviert.

2.2.5 Analytik

2.2.5.1 Fixierung

Die Aggregate der in vitro Versuchsreihe wurden fixiert und der histologischen Auswertung zugeführt.

Die Fixierung erfolgte 20 Minuten mit Standard-Fixans mit 0,5% Glutardialdehyd und weitere 40 Minuten mit Standard-Fixans ohne Glutaraldehyd. Anschließend wurden die Aggregate eine Stunde in Phosphatpuffer (0,1 M) überführt und dann in Saccharoselösungen aufsteigender Konzentration (10%, 20%, 30%, 40%) für je eine Stunde gespült. Danach wurde die Zuckerlösung mit Tissue Tek ersetzt. Die

Aggregate wurden auf dem Boden der Einbettformen in Tissue Tek orientiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.5.2 Histologische Auswertung und Färbungen

Nach oben genannter Fixierung, Einbettung in Tissue Tek und anschließendem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden Gefrierschnitte der Dicke 10 µm angefertigt und nach Aufziehen der Schnitte auf Objektträger unterschiedlich gefärbt und ausgewertet.

DMMB-Färbung

Nach fünfminütigem Spülen der Präparate mit Aqua dest. wurden die Schnitte für zwei Minuten mit 1,9 – Dimethyl – Methylen Blau überschichtet.

Das Auswaschen der Farblösung erfolgte zunächst kurz mit Aqua dest., anschließend durch Einbringen in eine Propanolreihe aufsteigender Konzentration (90%; 96%; 100%) und das Trocknen in 100% Xylol. Danach wurden die Präparate eingedeckelt.

Immunhistochemie (Kollagen II)

- 1) Dreimaliges Waschen der Präparate im Tris-Waschpuffer.
- 2) Andau mit Pepsinlösung für 15 min.
- 3) Dreimaliges Waschen mit Tris-Waschpuffer.
- 4) Waschen im Blocking Puffer für 30 min.
- 5) Primärantikörper zugeben und im Blocking Puffer über Nacht inkubieren.
Col II: MsIgG Endverdünnung 1:100
- 6) Dreimal mit Tris-Waschpuffer waschen.
- 7) Verstärkung der primären Antigen-Antikörper-Reaktion durch 60-minütiges Inkubieren mit einem Sekundärantikörper: Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-Anti-MouseIgG.

- 8) Erneutes dreimaliges Spülen mit Tris-Waschpuffer.
- 9) Blocken unspezifischer Peroxidasen durch Inkubation mit einem Gemisch aus 10% Methanol und 3% H₂O₂ in PBS für 30 Minuten.
- 10) Dreimaliges Waschen mit Tris-Waschpuffer.
- 11) Inkubation für 90 Minuten mit Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexen (ABC-Kit).
- 12) Gründliches Spülen mit Tris-Waschpuffer. Die ABC-Lösung muss vollständig entfernt sein.
- 13) Entwicklung mit DAB-Arbeitslösung unter mikroskopischer Kontrolle.
- 14) Stoppen der Färbung mit Waschpuffer mit Triton für einige Minuten.
- 15) Dreimal mit Waschpuffer mit Triton spülen.
- 16) Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe.
- 17) Eideckelung der Präparate mit DePex.

2.2.5.3 Kollagen II - ELISA

Vorbereitung der Proben

Die an Tag 1 und 21 entnommenen Aggregate wurden auf Basis des Protokolls des Native Type II Collagen Detection Kits (Chondrex, Redmond, USA) bearbeitet. Dazu wurden die Aggregate mit 200 µl 0,05 molarer Essigsäure mit 0,5 M NaCl und 25 µl Pepsin (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 4°C im Rotator angedaut. Anschließend wurden die Aggregate homogenisiert, erneut mit 200 µl Essigsäure/NaCl sowie 25 µl Pepsin versetzt und für weitere 48 Stunden bei 4°C im Rotator verdaut.

Anschließend wurden 50 µl 10x TBS hinzugefügt und der pH mit NaOH auf circa acht eingestellt, um eine optimale Elastasereaktion zu erreichen. Nun wurden 50 µl pankreatische Elastase (1 mg/ml) dazu pipettiert und die Proben für weitere 24 Stunden bei +4°C in den Rotator gestellt.

Im Weiteren wurden die Proben bei 10000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand mit dem im Kit enthaltenen Sample/Standard Dilution Buffer (Solution B) einer Verdünnungsreihe zugeführt. Die verbliebenen Probenreste wurden bei -20°C asserviert.

Der im Kit enthaltene Type II Collagen Standard wurde auf eine Konzentration von 0,2 µg/ml verdünnt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe 1:2 hergestellt.

Kollagen II – Assay

- 1) Vorbereiten der 96 well Platte: 100 µl gelöster Capture Antibody in jedes Well. Anschließend über Nacht bei 4°C inkubieren.
- 2) Sechsmaliges Waschen mit 1x Wash Buffer.
- 3) Je 100 µl der vorbereiteten Proben (siehe oben) sowie der Verdünnungen des Type II Collagen Standards (0,003 µg/ml – 0,2 µg/ml) auftragen und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubieren.
- 4) Sechsmaliges Waschen mit 1x Wash Buffer.
- 5) Je 100 µl gelösten Detection Antibody in jedes Well und weitere zwei Stunden inkubieren.
- 6) Sechsmaliges Waschen mit 1x Wash Buffer.
- 7) Je 100 µl gelöste Streptavidin Peroxidase in jedes Well pipettieren und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubieren.
- 8) Sechsmaliges Waschen mit 1x Wash Buffer.
- 9) Je 100 µl OPD-Lösung zufügen und 30 Minuten inkubieren.
- 10) Stoppen der Reaktion mit 50 µl 2N schwefelige Säure.
- 11) Photometrische Messung bei 490 nm.

2.2.5.4 Quantitative DNA-Analyse

In den für den Kollagen II - ELISA vorbereiteten Proben wurde auch der DNA-Gehalt mittels Quant iT Pico Green DNA Assay bestimmt.

Zunächst wurde der im Kit enthaltene 20x TE-Puffer (200 mM TRIS-HCL, 20 mM EDTA, pH=7,5) mit Millipore-Wasser 1:20 verdünnt, so dass der 1x TE-Arbeitspuffer entstand.

Anschließend wurde das Quant iT Pico Green Reagenz 1:200 mit TE-Puffer verdünnt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde der im Kit enthaltene DNA-Standard auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe 1:2 hergestellt.

Die wie unter 2.2.5.3 vorbereiteten Proben wurden vor der Messung 1:30 verdünnt.

Von den DNA-Standards und den Proben wurden je 100 µl pro Well auf eine 96 Well Platte aufgetragen und anschließend je 100 µl der Quant iT Pico Green Lösung zugegeben. Nach zwei bis fünf Minuten lichtgeschützter Inkubationszeit wurde die

Fluoreszenz gemessen (Excitation: 485 nm; Emission: 535 nm). Der DNA Gehalt in den Testproben wurde durch den Vergleich der Fluoreszenzwerte der Proben und der DNA-Standardreihe ermittelt.

2.2.6 Statistik

Um die einzelnen Zellreihen untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils der Kollagen II-Gehalt in Bezug zur entsprechenden DNA gesetzt. Die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen wurden berechnet und miteinander verglichen. Zur graphischen Darstellung wurde Microsoft Office Excel 2007 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM SPSS Statistics 19. Dabei wurde ein gepaarter T-Test angewendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Makroskopische Ergebnisse

Makroskopisch nehmen die vaskulären und avaskulären Meniskuszell-Aggregate zwischen Tag 1 und 21 deutlich an Größe zu.

Abbildung 3.1 zeigt ein makroskopisches Bild eines vaskulären Meniskusaggregats an Tag 1 repräsentativ für die gesamte Zelllinie an Tag 1.

Abbildung 3.2 zeigt das makroskopische Bild eines Aggregats aus Meniskuszellen des vaskulären Teils des gleichen Kaninchens an Tag 21. Man sieht die deutliche Größenzunahme von Tag 1 zu Tag 21.

Abbildung 3.3 und 3.4 zeigen Meniskuszellaggregate des avaskulären Teils an Tag 1 (Abbildung 3.3) und Tag 21 (Abbildung 3.4). Auch hier zeigt sich eine deutliche Größenzunahme der Aggregate.

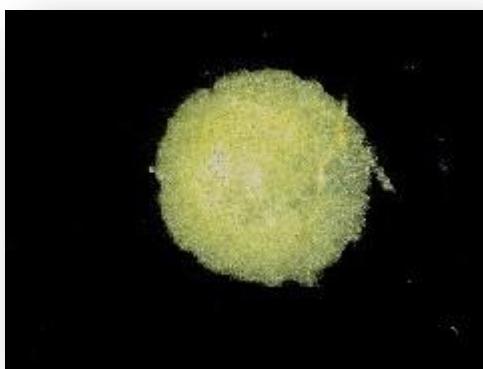


Abbildung 3.1: *Meniskuszellaggregat, vaskulär Tag 1*

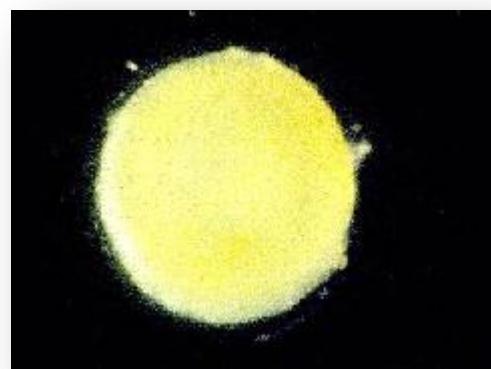


Abbildung 3.2: *Meniskuszellaggregat, vaskulär Tag 21*



Abbildung 3.3: *Meniskuszellaggregat, avaskulär Tag 1*



Abbildung 3.4: *Meniskuszellaggregat, avaskulär Tag 21*

Die Aggregate aus den mesenchymalen Stammzellen hingegen bleiben in Bezug auf die Größe in etwa gleich. Zwischen Tag 1 und Tag 7 findet sich eine dezente Größenabnahme, zwischen Tag 7 und 21 besteht dann aber keine Veränderung. Abbildung 3.5 zeigt ein Stammzellaggregat an Tag 1. In Abbildung 3.6 ist ein Stammzellaggregat an Tag 7 dargestellt, man sieht eine dezente Größenabnahme im Vergleich zu Tag 1.

Abbildung 3.7 und 3.8 zeigen Stammzellaggregate an Tag 14 (Abbildung 3.7) und Tag 21 (Abbildung 3.8). In Bezug auf die Größe bleiben die Aggregate zwischen Tag 7, 14 und 21 unverändert. Im Rahmen der Medienwechsel fällt auf, dass die Stammzellaggregate bei gleich bleibender Größe zwischen Tag 7 und 21 zunehmend fester in ihrer Konsistenz und damit formbeständiger werden.



Abbildung 3.5: Stammzellaggregat, Tag 1

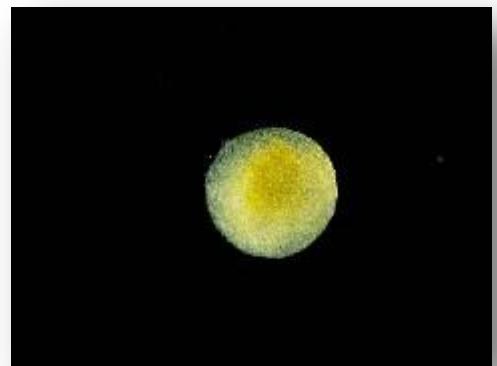


Abbildung 3.6: Stammzellaggregat, Tag 7



Abbildung 3.7: Stammzellaggregat, Tag 14



Abbildung 3.8: Stammzellaggregat, Tag 21

3.2 Histologische Ergebnisse

3.2.1 DMMB-Färbung

Die DMMB-Färbung ist bei allen Zellgruppen positiv. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 21 lassen sich Proteoglykane nachweisen. Die Färbung an Tag 21 verläuft jedoch deutlich intensiver.

Histologisch zeigt sich bei allen Zellgruppen an Tag 21 der typisch chondrogene Aufbau mit der ovalen bis runden Konfiguration der Chondrozyten. Die Zellen sind umgeben von perizellulären Vakuolen, zwischen den Zellen findet sich proteoglykanreiche Extrazellulärsubstanz.

Abbildungen 3.9 - 3.12 zeigen Aggregate aus Meniskuszellen des vaskulären Teils an Tag 1 und Tag 21 jeweils in vierfacher und zehnfacher Vergrößerung.

Abbildungen 3.13 - 3.16 zeigen Aggregate aus Meniskuszellen des avaskulären Teils an Tag 1 und Tag 21 jeweils in vierfacher und zehnfacher Vergrößerung.

In den Abbildungen 3.17 - 3.20 werden Stammzell-Aggregate an Tag 1 und Tag 21 jeweils in vierfacher und zehnfacher Vergrößerung dargestellt.

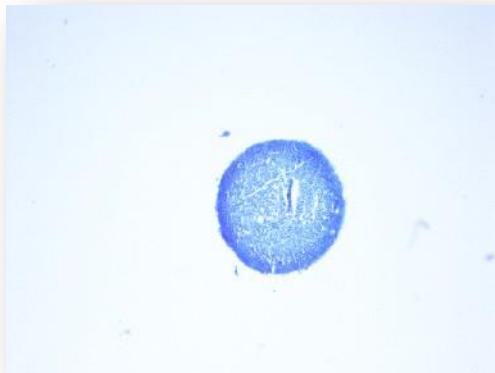


Abbildung 3.9: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 1 DMMB 4x

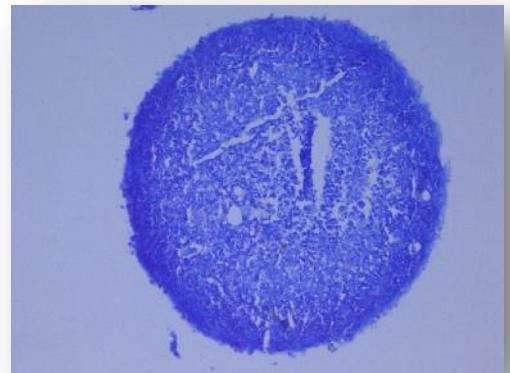


Abbildung 3.10: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 1 DMMB 10x

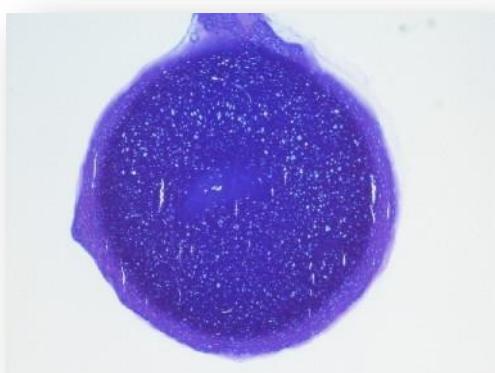


Abbildung 3.11: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 21 DMMB 4x

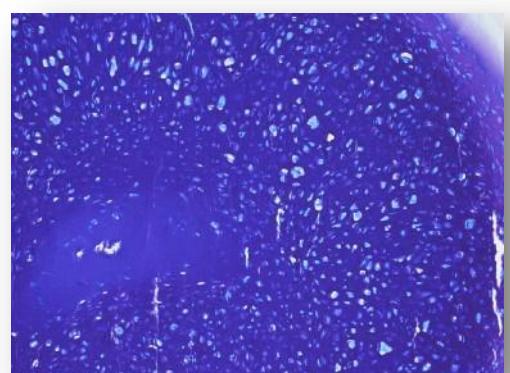


Abbildung 3.12: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 21 DMMB 10x



Abbildung 3.13: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 1 DMMB 4x

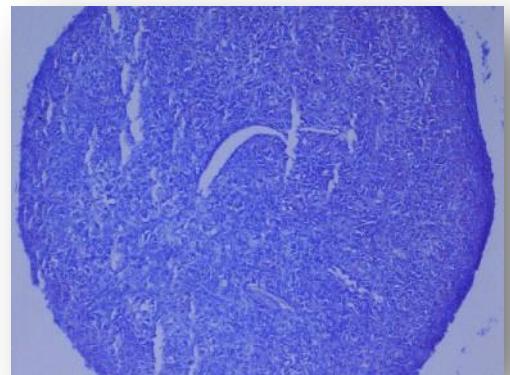


Abbildung 3.14: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 1 DMMB 10x

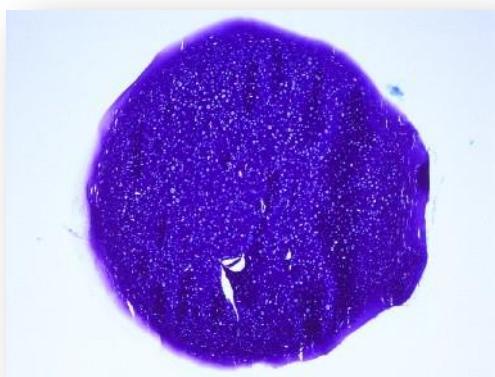


Abbildung 3.15: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 21 DMMB 4x

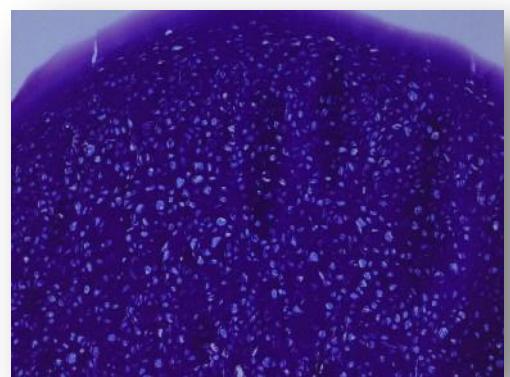


Abbildung 3.16: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 21 DMMB 10x

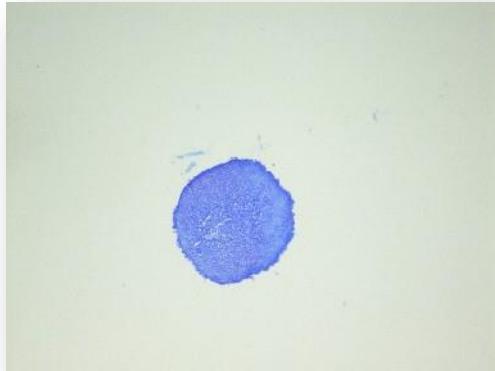


Abbildung 3.17: Stammzellaggregat, Tag 1
DMMB 4x

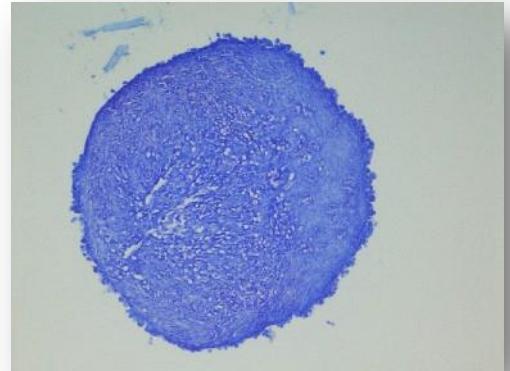


Abbildung 3.18: Stammzellaggregat, Tag 1
DMMB 10x

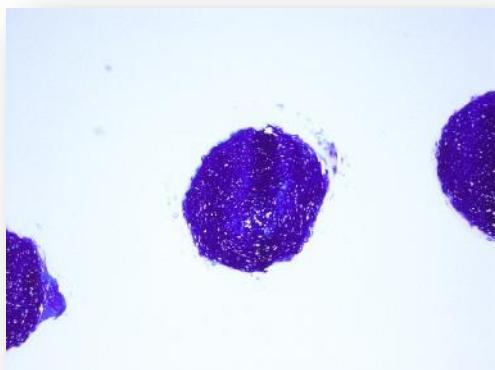


Abbildung 3.19: Stammzellaggregat, Tag 21
DMMB 4x

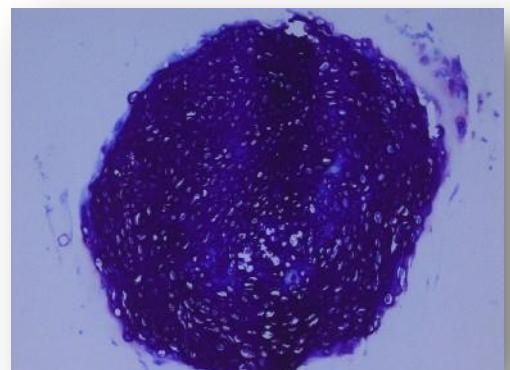


Abbildung 3.20: Stammzellaggregat, Tag 21
DMMB 10x

3.2.2 Kollagen II - Färbung

In vitro zeigt sich, dass alle Zellpopulationen, sowohl vaskuläre Meniskuszellen als auch avaskuläre Meniskuszellen sowie mesenchymale Stammzellen, Kollagen II produzieren.

An Tag 1 lässt sich bei keiner Zellpopulation Kollagen nachweisen. Die Kollagen II-Färbungen der vaskulären, avaskulären und Stammzell-Aggregate verlaufen negativ. Im Gegensatz dazu findet sich an Tag 21 bei allen Zellpopulationen Kollagen II. Die Aggregate sind intensiv angefärbt. Es zeigt sich hier ebenfalls der typisch chondrogene Aufbau.

Die Stammzell-Aggregate wurden zusätzlich noch an Tag 7 und 14 untersucht. Hierbei zeigt sich bereits an Tag 7 eine deutliche positive Kollagen II-Färbung, die auch an Tag 14 nachweisbar ist.



Abbildung 3.21: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 1 Col II 4x



Abbildung 3.22: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 1 Col II 10x



Abbildung 3.23: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 21 Col II 4x

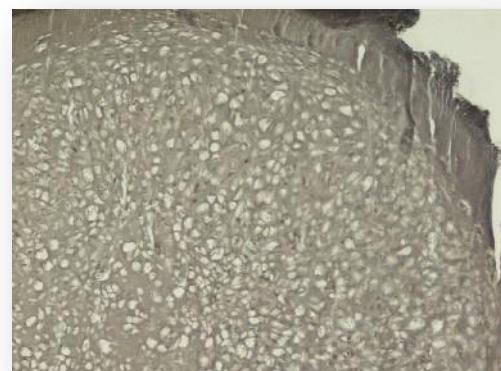


Abbildung 3.24: Meniskuszellaggregat, vaskulär
Tag 21 Col II 10x



Abbildung 3.25: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 1 Col II 4x

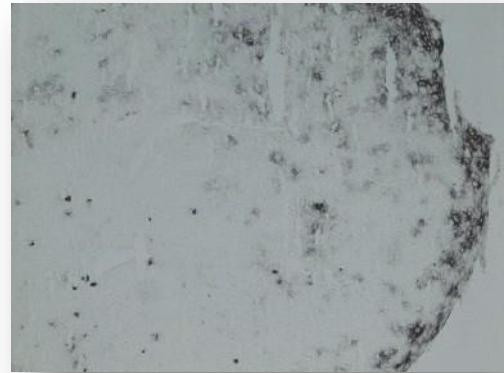


Abbildung 3.26: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 1 Col II 10x

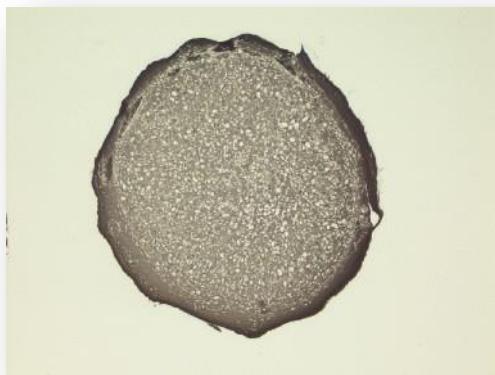


Abbildung 3.27: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 21 Col II 4x



Abbildung 3.28: Meniskuszellaggregat, avaskulär
Tag 21 Col II 10x

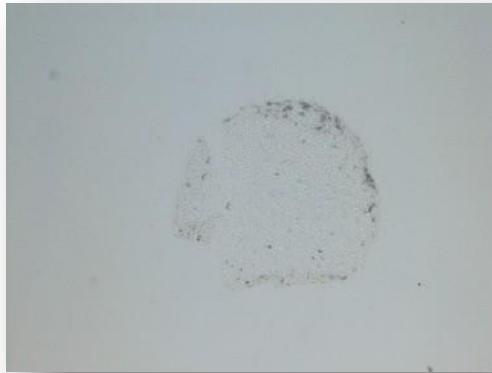


Abbildung 3.29: Stammzellaggregat, Tag 1
Col II 4x

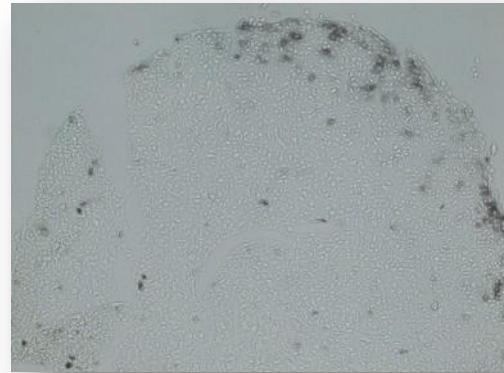


Abbildung 3.30: Stammzellaggregat, Tag 1
Col II 10x

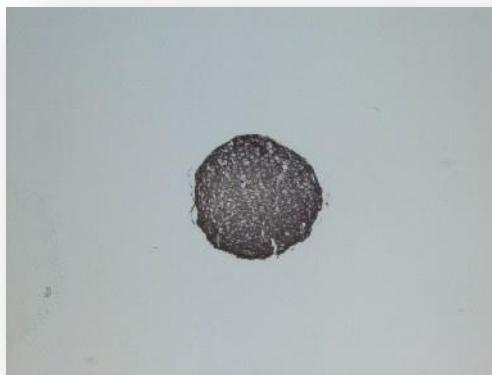


Abbildung 3.31: Stammzellaggregat, Tag 7
Col II 4x

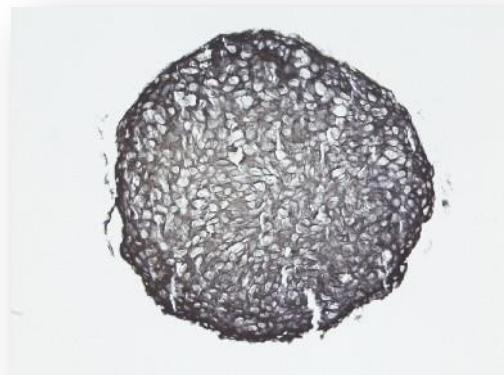


Abbildung 3.32: Stammzellaggregat, Tag 7
Col II 10x

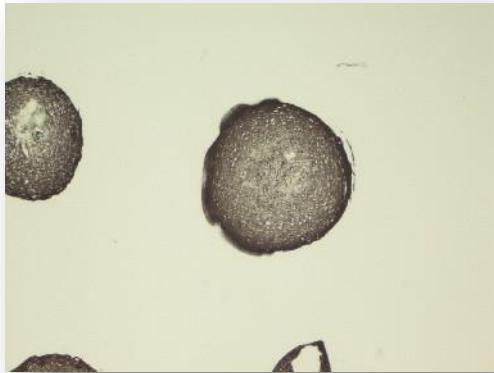


Abbildung 3.33: Stammzellaggregat, Tag 14
Col II 4x

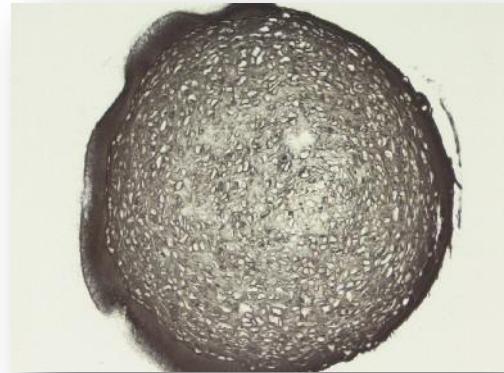


Abbildung 3.34: Stammzellaggregat, Tag 14
Col II 10x

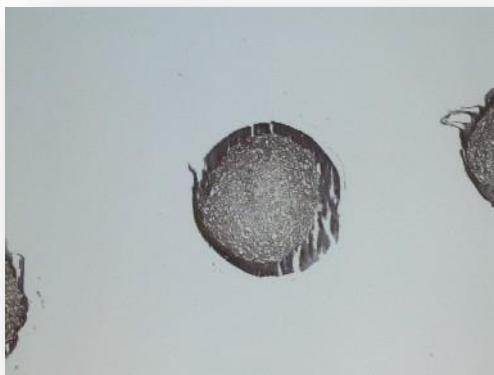


Abbildung 3.35: Stammzellaggregat, Tag 21
Col II 4x

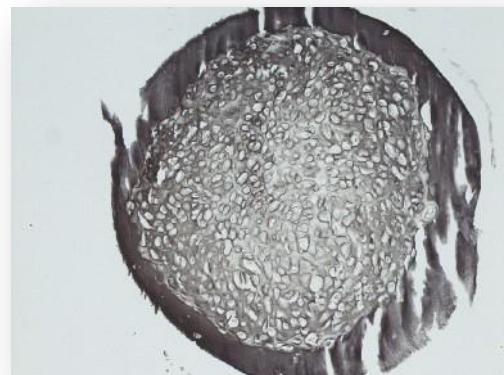


Abbildung 3.36: Stammzellaggregat, Tag 21
Col II 10x

3.3 Pico Green DNA Assay

Mit Hilfe eines Pico Green DNA Assays wurde der DNA-Gehalt der Aggregate an Tag 1 und Tag 21 bestimmt.

Dabei zeigt sich, dass der DNA-Gehalt der vaskulären und avaskulären Meniskuszellaggregate zwischen Tag 1 und 21 annäherungsweise gleich bleibt. Der DNA-Gehalt der Stammzell-Aggregate hingegen nimmt zwischen Tag 1 und Tag 21 ab.

3.4 Kollagen II - ELISA

Wie bereits in der Literatur beschrieben, enthält der Kaninchen-Meniskus im Gegensatz zum menschlichen Meniskus in erster Linie Kollagen II. Es wurde zur Bestimmung des chondrogenen Potentials der verschiedenen Zellgruppen des Kaninchen-Meniskus deshalb die quantitative Bestimmung von Kollagen II gewählt.

Bei der Aggregatherstellung wurden die Zellen ausgezählt und auf die gleiche Zellzahl pro Aggregat geachtet. Um die einzelnen Gruppen jedoch untereinander vergleichen zu können, wurde die quantitative Kollagen II-Bestimmung in Bezug zur vorhandenen DNA gesetzt. Somit wurde eine objektive und unter den Zellgruppen vergleichbare Größe geschaffen.

An Tag 1 lässt sich in allen drei Gruppen kaum Kollagen II nachweisen. An Tag 21 kann hingegen in allen drei Zellgruppen Kollagen II nachgewiesen werden. Diese Werte wurden anschließend in Bezug zur DNA gesetzt. Dabei zeigt sich in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg des Kollagen-II-Gehalts in Relation zur enthaltenen DNA von Tag 1 zu Tag 21 ($p < 0,01$).

Im Vergleich der Gruppen an Tag 21 untereinander lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen.

Unter Anwendung des T-Tests zeigt sich im Vergleich der Stammzell-Gruppe mit der vaskulären Gruppe an Tag 21 keine Signifikanz ($p = 0,734$). Ebenso verhält es sich im Vergleich der Stammzell-Aggregate mit den avaskulären Aggregaten jeweils an Tag 21 ($p = 0,250$). Auch die vaskuläre und avaskuläre Gruppe zeigen im direkten Vergleich keinen signifikanten Unterschied an Tag 21 ($p = 0,109$).

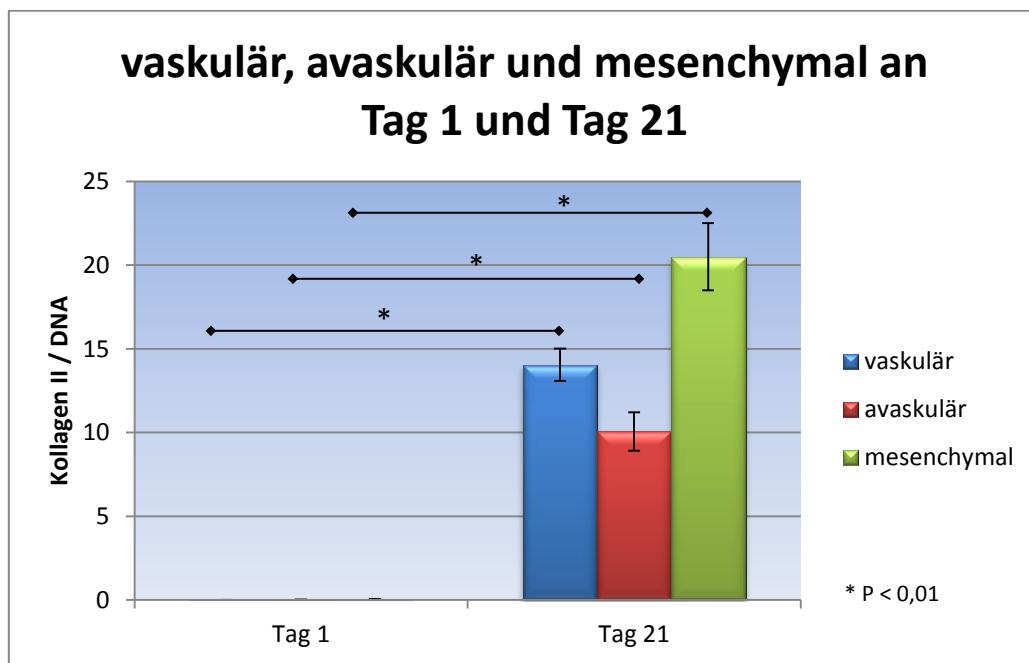


Abbildung 3.37: Kollagen II/DNA der Zellgruppen an Tag 1 und Tag 21

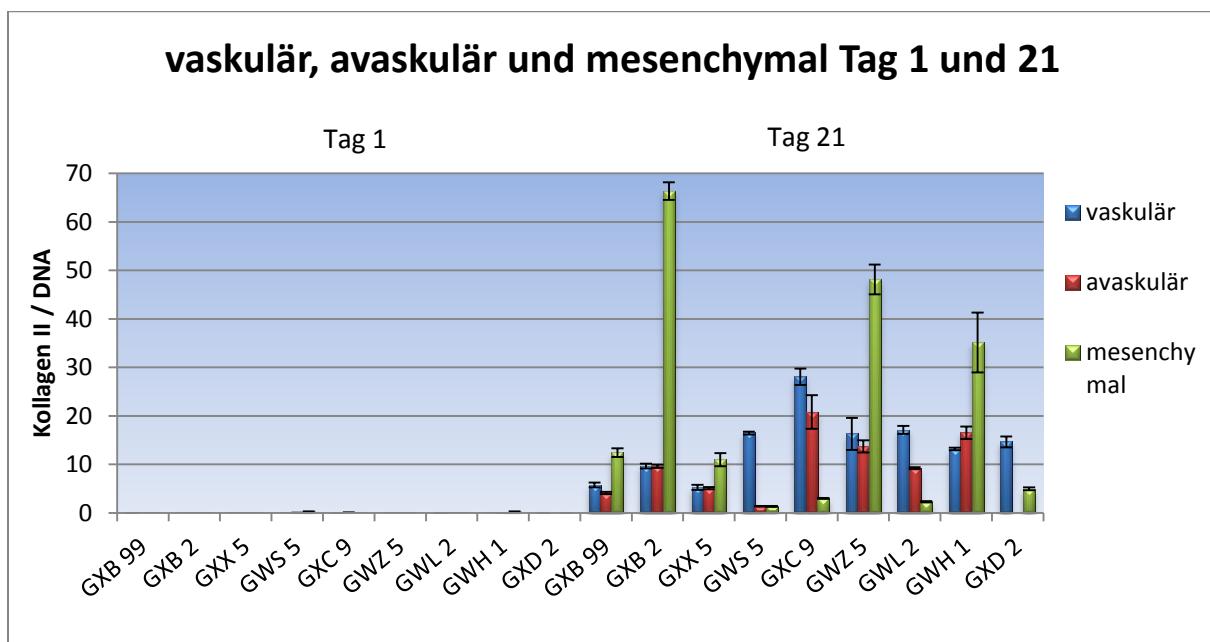


Abbildung 3.38: Kollagen II/ DNA der einzelnen Kaninchen und Zellgruppen an Tag 1 und Tag 21

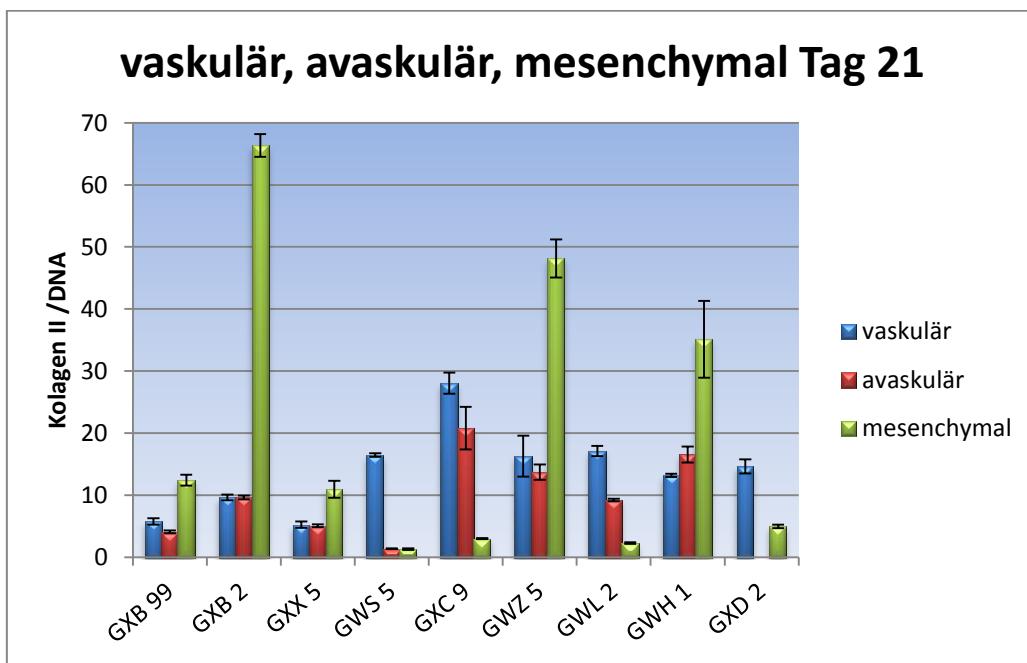


Abbildung 3.39: *Kollagen II/DNA an Tag 21 der einzelnen Kaninchen und Zellgruppen*

4 DISKUSSION

Tissue-Engineering stellt eine vielversprechende Therapie bei avaskulären Meniskusläsionen dar.

Diese Arbeit konnte erfolgreich das chondrogene Potential von mesenchymalen Stammzellen in vitro nachweisen und direkt mit dem chondrogenen Potential der gewebsspezifischen Meniskuszellen des vaskulären und avaskulären Bereichs in Vergleich setzen. Dabei zeigten sich in der in-vitro-Kultur auf zellulärer Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen vaskulären und avaskulären Meniskuszellen sowie den mesenchymalen Stammzellen. Alle drei Zellreihen synthetisierten unter in-vitro-Bedingungen Kollagen II.

Tissue-Engineering bezeichnet die Züchtung von Gewebe mit Hilfe einer Matrix, Zellen und entsprechenden Wachstumsfaktoren. Die Zellen stellen dabei den wichtigsten Faktor dar. Sie produzieren die extrazelluläre Matrix und führen somit zur Defektreparatur.

Zur Behandlung von Meniskusläsionen bieten sich zwei Zellarten an: einerseits mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, andererseits die originären organspezifischen Zellen, die autologen Meniskuszellen.

Angele et al. und Zellner et al. erzielten gute Erfolge bei der Defektreparatur von Meniskusläsionen mittels Tissue-Engineering von mesenchymalen Stammzellen^{7,159}. Peretti et al. transplantierten erfolgreich allogene Chondrozyten und wiesen damit einen Benefit für die Regeneration von Meniskusläsionen nach¹⁰⁷. Baker und Nathan isolierten 2009 humane Meniskuszellen aus Meniskusdebris von 10 Patienten im Alter zwischen 18 und 84 Jahren. Diese wurden kultiviert, auf biodegradable Matrices aufgetragen und anschließend für weitere 10 Wochen kultiviert. Nachweislich proliferierten alle Zellen. Zwar variierten die Ergebnisse der einzelnen Parameter, wie Zellintegration, Proteoglykan- und Kollagen-Gehalt, jedoch standen diese Unterschiede in keinem Zusammenhang mit dem Alter oder dem Erkrankungsfortschritt der Patienten. Die Studie belegte somit, dass autologe Meniskuszellen eine mögliche Quelle für Tissue-Engineering darstellen und diese Therapieform auch für ältere Patienten in Frage zu kommen scheint¹⁶.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide möglichen Zellarten, autologe Meniskuszellen und mesenchymale Stammzellen verwendet und miteinander verglichen.

Als naheliegendste Zellresource erscheint zur Reparatur von Meniskusläsionen die Verwendung der originären Zellen, der autologen Meniskuszellen.

In der klinischen Praxis zeigt sich, dass Läsionen der vaskularisierten äußeren Zone des Meniskus eine bessere Heilungstendenz aufweisen als Läsionen der avaskulären inneren Zone. Es stellt sich daher die Frage, ob die ungleiche Heilungstendenz allein auf die Unterschiede der Vaskularisierung oder doch auf unterschiedliche Zellfunktionen der verschiedenen Zonen zurückzuführen ist. Besitzen Zellen der äußeren Zone ein höheres Proliferationspotential als Zellen der inneren Zone? Liegen zwischen den beiden Zellarten Unterschiede in der Exprimierung von Extrazellulärsubstanz vor?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Meniskuszellen des vaskulären und avaskulären Teils des Meniskus getrennt voneinander kultiviert und vergleichend betrachtet. Die autologen Meniskuszellen sowohl der vaskulären als auch der avaskulären Zone wurden nach dem von Webber et al. entwickelten und in der Literatur bereits mehrfach erfolgreich angewendeten Protokoll zur Isolierung und Kultivierung von Knorpelzellen^{98,100,107,134,147-150} erfolgreich aus Menisken von New Zealand White Rabbits gewonnen und kultiviert.

Um in der Zellkultur der avaskulären Zellreihe sicher zu stellen, ausschließlich Zellen der rein avaskulären Zone des Meniskus zu bearbeiten, wurde in den vorliegenden Versuchen lediglich das innere Viertel bis Drittel für die avaskuläre Zellreihe verwendet. Somit stellten wir sicher, dass keine Zellen der rot-weißen Übergangszone in die Zellkultur der avaskulären Zellreihe gelangten.

Wie bereits beschrieben, nahmen die Meniskuszellaggregate zwischen Tag 1 und 21 deutlich an Größe zu. Um die persistierende Vitalität der Zellen während der Aggregat-Kultur nachzuweisen, wurde der DNA-Gehalt mittels Pico Green DNA Assay an Tag 1 und Tag 21 bestimmt. Dabei blieb der DNA-Gehalt der vaskulären und avaskulären Meniskuszellen zwischen Tag 1 und Tag 21 nahezu unverändert. Da der DNA-Gehalt in direktem Zusammenhang mit der Zellzahl steht, belegte dies die erfolgreiche Kultur der Meniskuszellen während der dreiwöchigen Aggregatzüchtung.

Die beobachtete Größenzunahme der Meniskuszellaggregate bei gleichbleibendem DNA-Gehalt entspricht somit einer Zunahme der extrazellulären Matrix.

Kambic und McDevitt wiesen 2004 im Hunde- bzw. Kaninchenmodell nach, dass Kollagen II ein dreidimensionales Netzwerk im Meniskus ausbildet und für die biomechanischen Aufgaben des Meniskus, wie mechanische Belastbarkeit gegenüber Zug- und Scherkräften, eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren zeigten sie ein Überwiegen von Kollagen II zur Meniskusspitze hin^{61,78,96}.

Auch Baker et al. konnten einen engen Zusammenhang zwischen dem Kollagengehalt und den mechanischen Zugeigenschaften der kultivierten meniskuszellbeladenen Matrixkonstrukte beobachten¹⁶.

Naumann et al. dokumentierten eine schwach positiv verlaufende Färbung für Kollagen I gegenüber einer diffusen Kollagen-II-Färbung am Kaninchenmeniskus¹⁰¹.

In der vorliegenden Arbeit kam daher Kollagen II als Vergleichsparameter zwischen den vaskulären und avaskulären Zellen zur Anwendung. Es erfolgten Kollagen II-Färbungen jeweils an den Tagen 1 und 21. Während sich an Tag 1 noch kein Kollagen II nachweisen ließ, verliefen die Färbungen an Tag 21 jeweils positiv und wiesen somit erfolgreich die Kollagen-II-Synthese nach.

Darüber hinaus erfolgte die Kollagen-II-Quantifizierung mittels Kollagen-II-ELISA, wobei sich eine Kollagen-II-Produktion für beide Zellarten, vaskulär sowie avaskulär, ergab. Den Kollagen-II-Gehalt in Bezug zur DNA gesetzt, lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellarten vor.

Beide Zellarten besaßen das gleiche Potential zur Kollagenproduktion.

Ebenso dokumentierten die durchgeführten DMMB-Färbungen keine Unterschiede zwischen den Zellaggregaten der vaskulären und avaskulären Region. In beiden Gruppen konnte das Vorliegen von Proteoglykanen nachgewiesen werden.

Der unterschiedlichen Heilungstendenz in vivo liegen demnach keine unterschiedlichen Zellfunktionen der vaskulären und avaskulären Meniskuszellen zugrunde. Unter gleichen in-vitro-Bedingungen liefern beide Zellarten in etwa gleich gute Ergebnisse.

Auch Hennerbichler et al. zeigten 2007 in einer in-vitro-Studie, dass unter gleichen Bedingungen für die innere und äußere Zone keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Reparaturfähigkeit der beiden Zonen vorliegen.

Dazu entnahmen sie zylindrische Meniskusexplantate der vaskulären und avaskulären Zone von Schweinemenisken, setzten diese sofort wieder in den Defekt

ein und kultivierten die Menisken für 2, 4 und 6 Wochen. Anschließend verglichen sie die beiden Versuchsgruppen hinsichtlich des Heilungspotentials, der Zellmigration und der Stärke des Reparaturgewebes. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zonen⁶¹.

In beiden Regionen kam es zu einer deutlichen Zunahme der Zellintegration und Stärke des Reparaturgewebes über den untersuchten Zeitraum. Ein signifikanter Unterschied auf zellulärer Ebene zwischen den beiden Meniskuszonen konnte nicht gezeigt werden⁶¹.

Collier und Gosh dokumentierten in Meniskusexplantaten eine Mehrproduktion von Proteoglykanen in der inneren Zone gegenüber der äußeren Zone. In der Monolayerkultur, in der gleiche Bedingungen für Zellen der inneren und äußeren Region herrschten, zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Exprimierung von Proteoglykanen zwischen den beiden Zonen²⁸.

Auch Mauck et al. untersuchten im Rindermodell den Unterschied zwischen Zellen der verschiedenen Regionen bezüglich ihrer multipotenten Differenzierungsfähigkeit (Chondrogenese, Adipogenese, Osteogenese) und verglichen diese mit dem Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen, einer Zellresource, die bekannt für ihre multipotenten Eigenschaften ist^{24,91,112,113}. Um festzustellen, ob auch regionale Unterschiede in der zellulären Komponente der endogenen Meniskusreparatur bestehen, untersuchte diese Studie das Differenzierungspotential der Meniskuszellen aus verschiedenen Regionen: des äußeren vaskulären Teils, der inneren avaskulären Zone und der Übergangsregion. Dabei zeigte sich, dass die Zellen aus allen drei Regionen über ein entsprechendes Differenzierungspotential verfügen⁹¹.

Die vorliegenden Ergebnisse bekräftigen somit die Theorie, dass den deutlichen regionalen Unterschieden in der Heilungstendenz *in vivo* keine Unterschiede im chondrogenen Potential zugrunde liegen, sondern diese vor allem von externen Faktoren, wie beispielsweise der unterschiedlichen Vaskularisation abhängig sind.

Andererseits findet man jedoch auch unterschiedliche Phänotypen von Meniskuszellen, abhängig von Ihrer Lokalisation innerhalb des Meniskus⁵⁸.

Nakata et al. gelang die Isolation von Subpopulationen der Meniskuszellen in der Monolayerkultur des humanen Menikus. Diese Subpopulationen lagen bei allen Patienten unabhängig ihres Alters vor. Bei der Zellkultur aus dem inneren Teil des Meniskus überwogen kleine runde chondrozytenähnliche Zellen, die gut voneinander getrennt in extrazelluläre Matrix eingebettet lagen^{58,100}. Im Gegensatz dazu fand man bei der Zellkultur aus der äußeren Meniskusregion überwiegend längliche, spindelförmige fibroblastenähnliche Zellen mit zahlreichen Ausläufern, die gap junctions mit den Nachbarzellen bildeten^{58,100}.

Auch wenn die Eigenschaften und Funktionen dieser Subpopulationen noch genauer geklärt werden müssen, so lässt sich doch vermuten, dass ihre unterschiedliche Verteilung innerhalb des Meniskus in Zusammenhang mit strukturellen und funktionellen Unterschieden zwischen den Regionen steht. Der innere Teil des Meniskus ist avaskulär und muss Druck- und Scherkräften standhalten. Die äußere eher vaskuläre Region des Meniskus besitzt dichte Fibrillen für Lubrikation und zur größeren Resistenz gegenüber Zug- und Ringspannungen^{132,134}. So scheint jeder Teil des Meniskus eine spezielle zelluläre Subpopulation zu beherbergen, abhängig von der individuellen Rolle, die er im Gelenkmechanismus spielt¹⁰⁰.

Trotz der unterschiedlichen phänotypischen Erscheinung der Subpopulationen bilden und remodellieren jedoch alle Meniskuszellen die extrazelluläre Matrix^{68,93} und können ihre biosynthetischen Aktivitäten als Antwort auf sich verändernde mechanische Ansprüche^{127,140} und beginnende Gelenkinstabilität anpassen^{59,60}.

Bisher wurde angenommen, dass endogene Reparaturvorgänge von Progenitorzellen, die innerhalb des entsprechenden Gewebes liegen, ausgehen. Sie wandern zur Läsion, proliferieren und exprimieren neue Matrix¹⁹. Zunehmend wurden aber in den entsprechenden Geweben Zellen entdeckt, die selbst einige multipotente Eigenschaften, sowie die Fähigkeit zu verschiedenen Zelltypen zu proliferieren, inne hatten^{4,18,40,133,161}: wie beispielsweise Knochen^{106,139}, Synovia^{31,103}, Herz- und Skelettmuskel^{146,152,158} und periodontale Bänder^{86,91,124}.

Wie bereits oben beschrieben, verglichen Mauck et al. Zellen der vaskulären und avaskulären Region sowie der Übergangszone von Rindermenisken bezüglich ihres chondrogenen, adipogenen und osteogenen Differenzierungspotentials. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Meniskuszellen aus allen Meniskusregionen die Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung besitzen⁹¹.

Ergänzend dazu gelang es Segawa et al. im Jahr 2008 mesenchymale Stammzellen aus Menisken zu isolieren¹²³.

In mesenchymalen Stammzellen ist, neben den gewebsspezifischen autologen Meniskuszellen, eine weitere Zellresource für Tissue-Engineering zu sehen. Adulte mesenchymale Stammzellen sind teilungsfähig und können zu verschiedenen mesenchymalen Phänotypen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Myozyten und Adipozyten differenzieren^{24,25,82,157}. Zusätzlich sezernieren mesenchymale Stammzellen eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die sowohl parakrine als auch autokrine Fähigkeiten besitzen und somit Auswirkungen auf ihre Zellumgebung haben. Diese sezernierten bioaktiven Faktoren unterdrücken das lokale Immunsystem, inhibieren die Fibrose und damit Narbenbildung ebenso wie Apoptose, beschleunigen die Angiogenese und stimulieren die Mitose sowie die Differenzierung von gewebsspezifischen Zellen bzw. Stammzellen^{24,25,57,82,99}.

Stammzellen aus dem Knochenmark weisen den großen Vorteil der leichten Verfügbarkeit auf. Ihre Gewinnung ist mit einem geringen Komplikationsrisiko und vergleichsweise relativ geringem Aufwand verbunden. Ein weiterer großer Vorteil der mesenchymalen Stammzellen liegt darin, dass sie in ausreichend großen Mengen verfügbar sind.

In der Literatur sind bereits gute Ergebnisse mit Stammzellen beschrieben.

Ischimura et al. zeigten 1997 im Kaninchenmodell, dass avaskuläre Meniskusdefekte, die mit Knochenmark und einem Fibrin-Clot behandelt wurden, schneller heilten als entsprechende Defekte, die nur mit einem Fibrin-Clot behandelt wurden. Dieser Unterschied wurde auf die pluripotenten Zellen mit Differenzierungspotential des Knochenmarks zurückgeführt^{71,72}.

Zellner zeigte jedoch, dass die Behandlung mit nicht vorbehandeltem Knochenmark und einer Hyaluronan-Gelatine-Kompositmatrix keinen signifikanten Benefit gegenüber der Behandlung mit einer leeren Kompositmatrix erbringt. Dies lässt sich vermutlich mit der geringen Anzahl an pluripotenten Zellen im Knochenmark erklären, welche nur auf 0,001% - 0,01% geschätzt wird^{82,159}.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass eine Isolierung und Vermehrung von mesenchymalen Stammzellen zu besseren Reparaturergebnissen führt¹¹².

In Vorarbeiten wurden bereits gute Ergebnisse mit Tissue-Engineering mit mesenchymalen Stammzellen beim Einsatz in Meniskusläsionen erzielt. So konnten Angele et al. bereits gute Reparatur-Ergebnisse in vivo erzielen, indem auf eine Hyaluronan-Gelatine-Kompositmatrix aufgebrachte mesenchymale Stammzellen in kombiniert vaskulär-avaskuläre Läsionen eingebracht wurden^{7,122}.

Zellner et al. dokumentierten weiter die chondrogene Durchbauung von rein avaskulären Meniskusläsionen mittels Tissue-Engineering von mesenchymalen Stammzellen¹⁵⁹.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mesenchymale Stammzellen unter in-vitro-Bedingungen Kollagen II produzieren und somit potentiell zur Meniskusdefektreparatur geeignet sind.

Die Stammzellaggregate waren zwischen Tag 1 und Tag 7 tendenziell etwas größengredient, zwischen Tag 7 und 21 blieben sie in etwa gleich groß.

Der zunächst beobachtete Größenverlust der Stammzell-Aggregate zwischen Tag 1 und 7 ließ sich durch die unvermeidliche Vordifferenzierung erklären. In der Monolayerkultur kam es vermutlich bei einigen der pluripotenten Stammzellen bereits zu einer Differenzierung. Zellmorphologisch handelte es sich dabei am ehesten um Fibrozyten, aber auch eine Differenzierung zu anderen Zellen ist nicht ausgeschlossen. Durch die Aggregatherstellung und die anschließende Kultivierung der Aggregate in chondrogenem Differenzierungsmedium kam es zum Absterben der vordifferenzierten Zellen. Lediglich die mesenchymalen Stammzellen bzw. die Meniskuszellen blieben im chondrogenen Differenzierungsmedium vital.

Der DNA-Gehalt steht in direktem Zusammenhang mit der Zellzahl. Die Abnahme des DNA-Gehalts der Stammzell-Aggregate von Tag 1 zu Tag 21 war auf die bereits oben beschriebene Vordifferenzierung zurückzuführen. Ein Überleben der vordifferenzierten Zellen war in dem chondrogenen Differenzierungsmedium nicht möglich. Man kann daher postulieren, dass diese zugrunde gegangenen Zellen nicht an der Kollagen II-Produktion beteiligt waren und das enthaltene Kollagen II somit ausschließlich von den an Tag 21 enthaltenen Zellen bzw. der an Tag 21 noch vorhandenen DNA exprimiert wurde.

Makroskopisch zeigte sich außerdem, dass die Größenabnahme der Stammzell-Aggregate bereits zwischen Tag 1 und 7 stattfand. Zwischen Tag 7 und 21 blieben die Aggregate bezüglich der Größe nahezu unverändert. Dies ist ein weiterer

Anhaltspunkt dafür, dass die DNA der vordifferenzierten Zellen bereits in den ersten Tagen zugrunde gegangen und somit an der Kollagen II- Produktion nicht beteiligt war.

Zudem war histologisch eine gute Differenzierung zu chondrogenen Zellen ersichtlich. Die Aggregate an Tag 21 zeigten den typisch chondrogenen Aufbau mit der ovalen bis runden Konfiguration der Chondrozyten. Die Zellen waren umgeben von perizellulären Vakuolen, eingebettet in proteoglykanreiche Extrazellulärsubstanz. Die Histologie wies dabei keinerlei Anzeichen eines Zelluntergangs auf, was ebenfalls darauf hinwies, dass die Zellen bereits in den ersten Tagen zugrunde gegangen und somit nicht an der Kollagen II Produktion beteiligt waren.

Auf Proteinebene konnte somit gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen chondrogen differenziert werden können. Entsprechend der Ergebnisse der autologen Meniskuszellreihe lieferte der Kollagen II-ELISA der Stammzell-Aggregate an Tag 1 keinen Nachweis von Kollagen II, wogegen an Tag 21 Kollagen II exprimiert wurde.

Auch Izuta et al. zeigten 2004 im Rattenmodell erfolgreich die Behandlung einer avaskulären Meniskusläsion mit mesenchymalen Stammzellen.

12 Wochen nach der Implantation eines mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Fibrin-Clots in eine zirkuläre avaskuläre Meniskusläsion zeigte sich die partielle Auffüllung des Defektes sowie die Bildung einer extrazellulären Matrix. Diese Ergebnisse wurden jedoch bei einer reinen in vitro-Versuchsanordnung erzielt und waren daher keiner biomechanischen Beanspruchung ausgesetzt^{73,156}.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass alle drei Zellarten, vaskuläre und avaskuläre Meniskuszellen sowie mesenchymale Stammzellen, unter in vitro-Bedingungen Kollagen II produzieren und somit potentiell zur Meniskusdefektreparatur geeignet sind.

Um die drei Zellgruppen bezüglich ihres chondrogenen Potentials untereinander vergleichen zu können, wurden die Kollagen-II-Werte anschließend in Bezug zur DNA gesetzt. Dabei ergaben sich für die Stammzell-Aggregate sowie die vaskulären und avaskulären Meniskuszellaggregate in etwa gleich gute Ergebnisse. Tendenziell schnitten die Stammzellaggregate etwas besser ab, ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Diese Ergebnisse wurden in parallelen in-vivo-Arbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Dabei wurde das chondogene Potential von autologen Meniskuszellen und mesenchymalen Stammzellen in der Therapie von avaskulären Meniskusläsionen mittels Tissue-Engineering am Kaninchenmodell in vivo erfasst und miteinander verglichen. Beide Gruppen zeigten gute Reparaturergebnisse mit chondriger Durchbauung der avaskulären Meniskusläsion. Tendenziell schnitten hier die mesenchymalen Stammzellen besser ab, jedoch ließ sich auch hier statistisch kein signifikanter Unterschied nachweisen.

In den in dieser Arbeit vorgestellten in-vitro-Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die mesenchymalen Stammzellen ebenso wie die vaskulären und avaskulären Meniskuszellen bezüglich ihres chondrogenen Potentials in etwa gleich gute Ergebnisse erzielen.

Dies widerlegt die Annahme, dass Zellen der vaskulären Zone ein höheres chondrogenes Potential besitzen als Zellen des avaskulären Bereichs.

Die These, dass die unterschiedliche Heilungstendenz von vaskulären und avaskulären Meniskusläsionen vor allem von unterschiedlichen externen Faktoren wie z.B. Durchblutung und Druckbelastung abhängig ist, jedoch aber nicht von den unterschiedlichen Zellpopulationen, wird bekräftigt.

Dennoch lassen verschiedene bereits aufgeführte Studien vermuten, dass neben externen Faktoren auch auf zellulärer Ebene regionale Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen bestehen, so dass hier noch weitere Studien folgen sollten.

Die vorgestellten Ergebnisse weisen die Eignung sowohl von autologen Meniskuszellen als auch mesenchymalen Stammzellen zur Reparatur von Meniskusläsionen nach.

Zu bedenken ist dabei jedoch, dass autologe Meniskuszellen nur in begrenztem Umfang verfügbar sind und ihre Gewinnung mit einem operativen Aufwand und damit einhergehender Patientenmorbidity korreliert. Des Weiteren impliziert die Gewinnung von autologen Meniskuszellen die Induktion eines Meniskusdefekts, dessen Behandlung das eigentliche Therapieziel ist, so dass die Isolierung von autologen Meniskuszellen eher kontraproduktiv scheint.

Im Gegensatz zu den autologen Meniskuszellen stehen mesenchymale Stammzellen in ausreichendem Umfang zur Verfügung und ihre Isolierung aus dem Knochenmark

ist mit einem geringen operativen Aufwand verbunden. Durch autogene Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen, anschließender chondrogener Differenzierung und Implantation in Meniskusläsionen lassen sich Immunreaktionen im Gegensatz zu allogenem Transplantationen deutlich reduzieren.

Auf Grund ihrer besseren Bioverfügbarkeit bei gleichem chondrogenen Potential scheinen daher mesenchymale Stammzellen für die Zukunft die vielversprechendere Zellresource in der Therapie von Meniskusläsionen zu sein.

Doch auch hier bedarf es weiterer eingehender Forschung. In den vorliegenden Versuchen konnte eine Vordifferenzierung der mesenchymalen Stammzellen nicht gänzlich vermieden werden. Vor Anwendung am Menschen sollten daher die Kultivierungs- und Differenzierungsabläufe optimiert werden, um bestmögliche Ergebnisse zu gewährleisten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Tissue-Engineering ist ein vielversprechender Ansatz zur Regeneration von Meniskusläsionen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl vaskuläre und avaskuläre Meniskuszellen als auch mesenchymale Stammzellen erfolgreich kultiviert und chondrogen differenziert werden können. Alle drei Zellreihen produzieren Kollagen II und sind damit potentiell für die Therapie von Meniskusläsionen geeignet.

Die Versuche bekräftigen die Theorie, dass die Unterschiede in der Heilungstendenz zwischen Läsionen der vaskulären und der avaskulären Zone der Menisken nicht auf zellulärer Ebene zu erklären sind. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das chondogene Potential der im vaskulären bzw. avaskulären Bereich angesiedelten Zellpopulationen besteht. Unter identischen in-vitro-Bedingungen zeigen beide Zellpopulationen ähnliche Ergebnisse.

Mesenchymale Stammzellen zeigen ebenso ein gutes chondrogenes Potential. Signifikante Unterschiede zwischen den organspezifischen Meniskuszellen und den mesenchymalen Stammzellen bestätigen sich nicht. In vitro liefern sie unter gleichen Bedingungen ebenso gute Ergebnisse wie die organspezifischen autologen Meniskuszellen aus der vaskulären bzw. avaskulären Region des Meniskus.

Autologe Meniskuszellen sind jedoch nur begrenzt verfügbar und ihre Gewinnung stellt zudem ein Problem dar. Um entsprechende Zellen zu isolieren, muss zusätzlich zur bereits vorhandenen therapiebedürftigen Meniskusläsion ein weiterer Defekt in den Meniskus gesetzt werden.

Im Gegensatz dazu sind mesenchymale Stammzellen deutlich leichter und in größeren Mengen verfügbar. Auf Grund der besseren Bioverfügbarkeit scheint daher die Zukunft der Reparatur von Meniskusläsionen mittels Tissue-Engineering in den mesenchymalen Stammzellen zu liegen.

6 LITERATUR

1. **Aagaard, H.; Jorgensen, U.; and Bojsen-Moller, F.:** Reduced degenerative articular cartilage changes after meniscal allograft transplantation in sheep. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 7(3): 184-91, 1999.
2. **Agneskirchner, J. D., and Lobenhoffer, P.:** Arthroskopische Meniskuschirurgie. *Der Unfallchirurg*, 107(09): 783-94, 2004.
3. **Ahmed, A. M.:** The load bearing role of the knee menisci. In *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. Edited by Mow, V. C.; Arnoczky, S. P.; and Jackson, D. W., New York, Raven Press, 1992.
4. **Alsalameh, S.; Amin, R.; Gemba, T.; and Lotz, M.:** Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50(5): 1522-32, 2004.
5. **Anagnostakos, K.; Bachelier, F.; and Kohn, D.:** Meniskuserkrankungen. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 1(5): 477-494, 2006.
6. **Anderson, D. D.; Chubinskaya, S.; Guillak, F.; Martin, J. A.; Oegema, T. R.; Olson, S. A.; and Buckwalter, J. A.:** Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res*, 29(6): 802-9.
7. **Angele, P.; Johnstone, B.; Kujat, R.; Zellner, J.; Nerlich, M.; Goldberg, V.; and Yoo, J.:** Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A*, 85(2): 445-55, 2008.
8. **Angele, P.; Kujat, R.; Nerlich, M.; Yoo, J.; Goldberg, V.; and Johnstone, B.:** Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng*, 5(6): 545-54, 1999.
9. **Arnoczky, S. P.:** Building a meniscus. Biologic considerations. *Clin Orthop Relat Res*, (367 Suppl): S244-53, 1999.
10. **Arnoczky, S. P.:** Gross and vascular anatomy of the meniscus and its role in meniscal healing, regeneration and remodeling. In *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. Edited by Mow, V. C.; Arnoczky, S. P.; and Jackson, D. W., New York, Raven Press, 1992.
11. **Arnoczky, S. P., and Warren, R. F.:** Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*, 10(2): 90-5, 1982.

12. **Arnoczky, S. P., and Warren, R. F.:** The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med*, 11(3): 131-41, 1983.
13. **Arnoczky, S. P.; Warren, R. F.; and Kaplan, N.:** Meniscal remodeling following partial meniscectomy--an experimental study in the dog. *Arthroscopy*, 1(4): 247-52, 1985.
14. **Arnoczky, S. P.; Warren, R. F.; and McDevitt, C. A.:** Meniscal replacement using a cryopreserved allograft. An experimental study in the dog. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 121-8, 1990.
15. **Arnoczky, S. P.; Warren, R. F.; and Spivak, J. M.:** Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 70(8): 1209-17, 1988.
16. **Baker, B. M.; Nathan, A. S.; Huffman, G. R.; and Mauck, R. L.:** Tissue engineering with meniscus cells derived from surgical debris. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(3): 336-45, 2009.
17. **Baratz, M. E.; Fu, F. H.; and Mengato, R.:** Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report. *Am J Sports Med*, 14(4): 270-5, 1986.
18. **Barbero, A.; Ploegert, S.; Heberer, M.; and Martin, I.:** Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 48(5): 1315-25, 2003.
19. **Barry, F. P.:** Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69(3): 250-6, 2003.
20. **Bennett, J. H.; Joyner, C. J.; Triffitt, J. T.; and Owen, M. E.:** Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci*, 99 (Pt 1): 131-9, 1991.
21. **Bullough, P. G.; Munuera, L.; Murphy, J.; and Weinstein, A. M.:** The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg Br*, 52(3): 564-7, 1970.
22. **Buma, P.; Ramrattan, N. N.; van Tienen, T. G.; and Veth, R. P.:** Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials*, 25(9): 1523-32, 2004.
23. **Burr, D. B., and Radin, E. L.:** Meniscal function and the importance of meniscal regeneration in preventing late medial compartment osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, (171): 121-6, 1982.

24. **Caplan, A. I.:** Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5): 641-50, 1991.
25. **Caplan, A. I., and Dennis, J. E.:** Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98(5): 1076-84, 2006.
26. **Cerulli, G.; Ceccarini, A.; Alberti, P.; and Caraffa, A.:** Study on the Mechanoreceptors in the Human Menisci. In *Fourth Congress of the International Society of the Knee. Proceedings of the International Society of the Knee* pp. 428-444. Edited, 428-444, Salzburg, Austria, Am J Sports Med, 1985.
27. **Cheung, H. S.:** Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res*, 16(4): 343-56, 1987.
28. **Collier, S., and Ghosh, P.:** Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*, 3(2): 127-38, 1995.
29. **Cox, J. S.; Nye, C. E.; Schaefer, W. W.; and Woodstein, I. J.:** The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. *Clin Orthop Relat Res*, (109): 178-83, 1975.
30. **Cravener, E. K., and MacElroy, D. G.:** INJURIES OF THE INTERNAL SEMILUNAR CARTILAGE POSSIBLE PREDISPOSITION TOWARD; SYMPTOMS AND TREATMENT. *Journal of the American Medical Association*, 117(20): 1695-1700, 1941.
31. **De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Vandenabeele, F.; Vermeesch, J. R.; Raymackers, J. M.; and Luyten, F. P.:** Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*, 160(6): 909-18, 2003.
32. **Debrunner, A. M.:** Orthopädie, Orthopädische Chirurgie. Edited, Bern, Hans Huber Verlag, 2002.
33. **DeHaven, K. E.:** Meniscus repair. *Am J Sports Med*, 27(2): 242-50, 1999.
34. **Dexter, T. M.; Allen, T. D.; and Lajtha, L. G.:** Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*, 91(3): 335-44, 1977.
35. **Dienst, M., and Kohn, D.:** [Allogenic meniscus transplantation]. *Oper Orthop Traumatol*, 18(5-6): 463-80, 2006.
36. **Duparc, J.:** Chirurgische Techniken in Orthopädie und Traumatologie - Oberschenkel und Knie. Edited, München, Urban Fischer, 2005.

37. **Efe, T.; Getgood, A.; Schofer, M. D.; Fuchs-Winkelmann, S.; Mann, D.; Paletta, J. R.; and Heyse, T. J.:** The safety and short-term efficacy of a novel polyurethane meniscal scaffold for the treatment of segmental medial meniscus deficiency. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*
38. **Elliott, D. M.; Guilak, F.; Vail, T. P.; Wang, J. Y.; and Setton, L. A.:** Tensile properties of articular cartilage are altered by meniscectomy in a canine model of osteoarthritis. *J Orthop Res*, 17(4): 503-8, 1999.
39. **Englund, M., and Lohmander, L. S.:** Risk factors for symptomatic knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy. *Arthritis Rheum*, 50(9): 2811-9, 2004.
40. **Erickson, G. R.; Gimble, J. M.; Franklin, D. M.; Rice, H. E.; Awad, H.; and Guilak, F.:** Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(2): 763-9, 2002.
41. **Eyre, D. R., and Wu, J. J.:** Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett*, 158(2): 265-70, 1983.
42. **Fairbank, T. J.:** Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br*, 30B(4): 664-70, 1948.
43. **Ficklscherer, A.:** BASICS - Orthopädie und Traumatologie. Edited, München, Urban Fischer Verlag, 2005.
44. **Fithian, D. C.; Kelly, M. A.; and Mow, V. C.:** Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 19-31, 1990.
45. **Fowlie, J. G.; Arnoczky, S. P.; Stick, J. A.; and Pease, A. P.:** Meniscal translocation and deformation throughout the range of motion of the equine stifle joint: an in vitro cadaveric study. *Equine Vet J*, 43(3): 259-64.
46. **Friedenstein, A. J.; Chailakhyan, R. K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; and Keiliss-Borok, I. V.:** Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4): 331-40, 1974.
47. **Gao, J., and Messner, K.:** Natural healing of anterior and posterior attachments of the rabbit meniscus. *Clin Orthop Relat Res*, (328): 276-84, 1996.
48. **Gear, M. W.:** The late results of meniscectomy. *Br J Surg*, 54(4): 270-2, 1967.

49. **Gesundheitsberichterstattung, d. B.:** Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. Edited, gbe-bund.de, 2010.
50. **Gesundheitsberichterstattung, d. B.:** Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. Edited, gbe-bund.de, 2010.
51. **Gesundheitsberichterstattung, d. B.; Robert-Koch-Instituts, A. E. u. G. d.; and Bundesamtes, G. G. d. S.:** Gesundheitsbericht 2006 - Gesundheit in Deutschland. In *Gesundheitsbericht 2006*. Edited, gbe-bund.de, 2006.
52. **Ghosh, P., and Taylor, T. K.:** The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop Relat Res*, (224): 52-63, 1987.
53. **Goble, E. M.; Kohn, D.; Verdonk, R.; and Kane, S. M.:** Meniscal substitutes--human experience. *Scand J Med Sci Sports*, 9(3): 146-57, 1999.
54. **Goble, E. M.; Verdonk, R.; and Kohn, D.:** Arthroscopic and open surgical techniques for meniscus replacement--meniscal allograft transplantation and tendon autograft transplantation. *Scand J Med Sci Sports*, 9(3): 168-76, 1999.
55. **Harston, A.; Nyland, J.; Brand, E.; McGinnis, M.; and Caborn, D. N.:** Collagen meniscus implantation: a systematic review including rehabilitation and return to sports activity. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 20(1): 135-46, 2011.
56. **Hattan, N.; Kawaguchi, H.; Ando, K.; Kuwabara, E.; Fujita, J.; Murata, M.; Suematsu, M.; Mori, H.; and Fukuda, K.:** Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res*, 65(2): 334-44, 2005.
57. **Haynesworth, S. E.; Baber, M. A.; and Caplan, A. I.:** Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*, 166(3): 585-92, 1996.
58. **Hellio Le Graverand, M. P.; Ou, Y.; Schield-Yee, T.; Barclay, L.; Hart, D.; Natsume, T.; and Rattner, J. B.:** The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat*, 198(Pt 5): 525-35, 2001.
59. **Hellio Le Graverand, M. P.; Vignon, E.; Otterness, I. G.; and Hart, D. A.:** Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I: cellular and matrix alterations. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(1): 56-64, 2001.

60. **Hellio Le Graverand, M. P.; Vignon, E.; Otterness, I. G.; and Hart, D. A.:** Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part II: molecular alterations. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(1): 65-72, 2001.
61. **Hennerbichler, A.; Moutos, F. T.; Hennerbichler, D.; Weinberg, J. B.; and Guilak, F.:** Repair response of the inner and outer regions of the porcine meniscus in vitro. *Am J Sports Med*, 35(5): 754-62, 2007.
62. **Henning, C. E.:** Current status of meniscus salvage. *Clin Sports Med*, 9(3): 567-76, 1990.
63. **Henning, C. E.:** Semilunar cartilage of the knee: function and pathology. *Exerc Sport Sci Rev*, 16: 205-13, 1988.
64. **Henning, C. E.; Lynch, M. A.; and Clark, J. R.:** Vascularity for healing of meniscus repairs. *Arthroscopy*, 3(1): 13-8, 1987.
65. **Henning, C. E.; Lynch, M. A.; Yearout, K. M.; Vequist, S. W.; Stallbaumer, R. J.; and Decker, K. A.:** Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 64-72, 1990.
66. **Henning, C. E.; Yearout, K. M.; Vequist, S. W.; Stallbaumer, R. J.; and Decker, K. A.:** Use of the fascia sheath coverage and exogenous fibrin clot in the treatment of complex meniscal tears. *Am J Sports Med*, 19(6): 626-31, 1991.
67. **Hoch, D. H.; Grodzinsky, A. J.; Koob, T. J.; Albert, M. L.; and Eyre, D. R.:** Early changes in material properties of rabbit articular cartilage after meniscectomy. *J Orthop Res*, 1(1): 4-12, 1983.
68. **Hukins, D. W. L., and Adams, M. E.:** The extracellular matrix of the meniscus. In *Knee Meniscus: Basic and Clinical Foundations*. Edited by Mow, V. C.; Arnoczky, S. P.; and Jackson, D. W., New York, Raven Press, 1992.
69. **Hunter, R. E., and Sgaglione, N. A.:** The Knee. Edited, Philadelphia, Saunders Elsevier, 2010.
70. **Ibarra, C.; Koski, J. A.; and Warren, R. F.:** Tissue engineering meniscus: cells and matrix. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 411-8, 2000.
71. **Ishimura, M.; Ohgushi, H.; Habata, T.; Tamai, S.; and Fujisawa, Y.:** Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part I: Experimental study. *Arthroscopy*, 13(5): 551-7, 1997.

72. **Ishimura, M.; Ohgushi, H.; Habata, T.; Tamai, S.; and Fujisawa, Y.:** Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part II: Clinical applications. *Arthroscopy*, 13(5): 558-63, 1997.
73. **Izuta, Y.; Ochi, M.; Adachi, N.; Deie, M.; Yamasaki, T.; and Shinomiya, R.:** Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *Knee*, 12(3): 217-23, 2005.
74. **Jiang, Y. et al.:** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893): 41-9, 2002.
75. **Johnson, D.:** Arthroscopic Meniscus Repair. Edited.
76. **Johnson, L. L., and Feagin, J. A., Jr.:** Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study. *Arthroscopy*, 16(2): 191-6, 2000.
77. **Junqueira, L. C. U., and Carneiro, J.:** Histologie. Edited by Gratzl, M., Springer Verlag, 2005.
78. **Kambic, H. E., and McDevitt, C. A.:** Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus. *J Orthop Res*, 23(1): 142-9, 2005.
79. **Kohn, D.:** Das Knie. Edited, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2000.
80. **Kopf, S.; Birkenfeld, F.; Becker, R.; Petersen, W.; Starke, C.; Wruck, C. J.; Tohidnezhad, M.; Varoga, D.; and Pufe, T.:** Local treatment of meniscal lesions with vascular endothelial growth factor. *J Bone Joint Surg Am*, 92(16): 2682-91, 2010.
81. **Koski, J. A.; Ibarra, C.; Rodeo, S. A.; and Warren, R. F.:** Meniscal injury and repair: clinical status. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 419-36, 2000.
82. **Krampera, M.; Franchini, M.; Pizzolo, G.; and Aprili, G.:** Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus*, 5(3): 120-9, 2007.
83. **Krause, W. R.; Pope, M. H.; Johnson, R. J.; and Wilder, D. G.:** Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 58(5): 599-604, 1976.
84. **Kummer, B.:** Biomechanik des Meniskus. *Der Orthopäde*, 23: 90-92, 1994.
85. **Lanzer, W. L., and Komenda, G.:** Changes in articular cartilage after meniscectomy. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 41-8, 1990.
86. **Lekic, P., and McCulloch, C. A.:** Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*, 245(2): 327-41, 1996.

87. **LeRoux, M. A.; Arokoski, J.; Vail, T. P.; Guilak, F.; Hyttinen, M. M.; Kiviranta, I.; and Setton, L. A.:** Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. *J Orthop Res*, 18(3): 383-92, 2000.
88. **Levy, I. M.; Torzilli, P. A.; and Warren, R. F.:** The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am*, 64(6): 883-8, 1982.
89. **Lippert, H.:** Lehrbuch Anatomie. Edited, München, Elsevier Urban Fischer Verlag, 2006.
90. **Macausland, W. R.:** Derangements of the Semilunar Cartilages: Based on a Study of 388 Operative Cases. *Ann Surg*, 93(3): 649-82, 1931.
91. **Mauck, R. L.; Martinez-Diaz, G. J.; Yuan, X.; and Tuan, R. S.:** Regional multilineage differentiation potential of meniscal fibrochondrocytes: implications for meniscus repair. *Anat Rec (Hoboken)*, 290(1): 48-58, 2007.
92. **McDermott, I.:** Meniscal tears, repairs and replacement: their relevance to osteoarthritis of the knee. *Br J Sports Med*, 45(4): 292-7.
93. **McDevitt, C. A., and Webber, R. J.:** The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 8-18, 1990.
94. **Meyer, R. P., and Gächter, A.:** Kniechirurgie in der Praxis. Edited, Berlin, Springer Verlag, 2002.
95. **Monllau, J. C.; Gelber, P. E.; Abat, F.; Pelfort, X.; Abad, R.; Hinarejos, P.; and Tey, M.:** Outcome after partial medial meniscus substitution with the collagen meniscal implant at a minimum of 10 years' follow-up. *Arthroscopy*, 27(7): 933-43.
96. **Moutos, F. T., and Guilak, F.:** Composite scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biorheology*, 45(3-4): 501-12, 2008.
97. **Mow, V. C.; Ratcliffe, A.; Chern, K. Y.; and Kelly, M. A.:** Structure and function relationships of the menisci of the knee. In *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. Edited by Mow, V. C.; Arnoczky, S. P.; and Jackson, D. W., New York, Raven Press, 1992.
98. **Mueller, S. M.; Shortkroff, S.; Schneider, T. O.; Breinan, H. A.; Yannas, I. V.; and Spector, M.:** Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro. *Biomaterials*, 20(8): 701-9, 1999.

99. **Murphy, J. M.; Fink, D. J.; Hunziker, E. B.; and Barry, F. P.:** Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 48(12): 3464-74, 2003.
100. **Nakata, K. et al.:** Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl): S208-18, 2001.
101. **Naumann, A.; Dennis, J. E.; Awadallah, A.; Carrino, D. A.; Mansour, J. M.; Kastenbauer, E.; and Caplan, A. I.:** Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*, 50(8): 1049-58, 2002.
102. **Niethard, F., and Pfeil, J.:** Duale Reihe - Orthopädie. Edited, Stuttgart, Hippokrates Verlag GmbH, 2009.
103. **Nishimura, K.; Solchaga, L. A.; Caplan, A. I.; Yoo, J. U.; Goldberg, V. M.; and Johnstone, B.:** Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 42(12): 2631-7, 1999.
104. **O'Connor, B. L.:** The histological structure of dog knee menisci with comments on its possible significance. *Am J Anat*, 147(4): 407-17, 1976.
105. **Okuda, K.; Ochi, M.; Shu, N.; and Uchio, Y.:** Meniscal rasping for repair of meniscal tear in the avascular zone. *Arthroscopy*, 15(3): 281-6, 1999.
106. **Osyczka, A. M.; Noth, U.; Danielson, K. G.; and Tuan, R. S.:** Different osteochondral potential of clonal cell lines derived from adult human trabecular bone. *Ann N Y Acad Sci*, 961: 73-7, 2002.
107. **Peretti, G. M.; Caruso, E. M.; Randolph, M. A.; and Zaleske, D. J.:** Meniscal repair using engineered tissue. *J Orthop Res*, 19(2): 278-85, 2001.
108. **Petersen, W. et al.:** The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. *Arch Orthop Trauma Surg*, 127(4): 235-40, 2007.
109. **Petersen, W.; Pufe, T.; Starke, C.; Fuchs, T.; Kopf, S.; Raschke, M.; Becker, R.; and Tillmann, B.:** Locally applied angiogenic factors--a new therapeutic tool for meniscal repair. *Ann Anat*, 187(5-6): 509-19, 2005.
110. **Petersen, W., and Tillmann, B.:** Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl)*, 197(4): 317-24, 1998.
111. **Petrosini, A. V., and Sherman, O. H.:** A historical perspective on meniscal repair. *Clin Sports Med*, 15(3): 445-53, 1996.

112. **Pittenger, M. F. et al.:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-7, 1999.
113. **Prockop, D. J.:** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309): 71-4, 1997.
114. **Radin, E. L.; de Lamotte, F.; and Maquet, P.:** Role of the menisci in the distribution of stress in the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (185): 290-4, 1984.
115. **Rath, E., and Richmond, J. C.:** The menisci: basic science and advances in treatment. *Br J Sports Med*, 34(4): 252-7, 2000.
116. **Rodkey, W. G.; DeHaven, K. E.; Montgomery, W. H., 3rd; Baker, C. L., Jr.; Beck, C. L., Jr.; Hormel, S. E.; Steadman, J. R.; Cole, B. J.; and Briggs, K. K.:** Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 90(7): 1413-26, 2008.
117. **Rodkey, W. G.; Steadman, J. R.; and Li, S. T.:** A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus. *Clin Orthop Relat Res*, (367 Suppl): S281-92, 1999.
118. **Roos, E. M.; Ostenberg, A.; Roos, H.; Ekdahl, C.; and Lohmander, L. S.:** Long-term outcome of meniscectomy: symptoms, function, and performance tests in patients with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(4): 316-24, 2001.
119. **Roughley, P. J.; McNicol, D.; Santer, V.; and Buckwalter, J.:** The presence of a cartilage-like proteoglycan in the adult human meniscus. *Biochem J*, 197(1): 77-83, 1981.
120. **Sanchez-Ramos, J. et al.:** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 164(2): 247-56, 2000.
121. **Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U.; Voll, M.; and Wesker, K.:** Prometheus - Lernatlas der Anatomie; Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Edited, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2007.
122. **Schumann, D.; Kujat, R.; Nerlich, M.; and Angele, P.:** Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng*, 16(4 Suppl): S37-52, 2006.
123. **Segawa, Y.; Muneta, T.; Makino, H.; Nimura, A.; Mochizuki, T.; Ju, Y. J.; Ezura, Y.; Umezawa, A.; and Sekiya, I.:** Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular

- chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res*, 27(4): 435-41, 2009.
124. **Seo, B. M.; Miura, M.; Sonoyama, W.; Coppe, C.; Stanyon, R.; and Shi, S.:** Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*, 84(10): 907-12, 2005.
125. **Setton, L. A.; Guilak, F.; Hsu, E. W.; and Vail, T. P.:** Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res*, (367 Suppl): S254-72, 1999.
126. **Shibuya, S.:** Meniscus transplantation using a cryopreserved allograft. Histological and ultrastructural study of the transplanted meniscus. *J Orthop Sci*, 4(2): 135-41, 1999.
127. **Shin, S. J.; Fermor, B.; Weinberg, J. B.; Pisetsky, D. S.; and Guilak, F.:** Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide. *J Appl Physiol*, 95(1): 308-13, 2003.
128. **Shoemaker, S. C., and Markolf, K. L.:** The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee. Effects of partial versus total excision. *J Bone Joint Surg Am*, 68(1): 71-9, 1986.
129. **Sobotta, J.:** Atlas der Anatomie des Menschen - limitierte Jubiläumsausgabe: der komplette Altlat in einem Band. Edited by Putz, R., and Pabst, R., München, Elsevier Urban Fischer Verlag, 2004.
130. **Stollsteimer, G. T.; Shelton, W. R.; Dukes, A.; and Bomboy, A. L.:** Meniscal allograft transplantation: a 1- to 5-year follow-up of 22 patients. *Arthroscopy*, 16(4): 343-7, 2000.
131. **Stone, K. R.:** Current and future directions for meniscus repair and replacement. *Clin Orthop Relat Res*, (367 Suppl): S273-80, 1999.
132. **Stone, K. R.; Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; and Li, S. T.:** Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data. *J Bone Joint Surg Am*, 79(12): 1770-7, 1997.
133. **Tallheden, T.; Dennis, J. E.; Lennon, D. P.; Sjogren-Jansson, E.; Caplan, A. I.; and Lindahl, A.:** Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2: 93-100, 2003.
134. **Tanaka, T.; Fujii, K.; and Kumagae, Y.:** Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer

- regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 7(2): 75-80, 1999.
135. **Tapper, E. M., and Hoover, N. W.:** Late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 51(3): 517-26 passim, 1969.
136. **Tienken, T. G.; Heijkants, R. G.; de Groot, J. H.; Pennings, A. J.; Schouten, A. J.; Veth, R. P.; and Buma, P.:** Replacement of the knee meniscus by a porous polymer implant: a study in dogs. *Am J Sports Med*, 34(1): 64-71, 2006.
137. **Tillmann, B. S., M.:** Struktur und Funktion extrazellulärer Matrix. *Anatomischer Anzeiger*, 168(Suppl): p. 23-26, 1991.
138. **Trillat, A.:** [Traumatic lesions of the internal meniscus of the knee. Anatomical classification and clinical diagnosis]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, 48: 551-60, 1962.
139. **Tuli, R. et al.:** Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*, 21(6): 681-93, 2003.
140. **Upton, M. L.; Chen, J.; Guilak, F.; and Setton, L. A.:** Differential effects of static and dynamic compression on meniscal cell gene expression. *J Orthop Res*, 21(6): 963-9, 2003.
141. **van Arkel, E. R., and de Boer, H. H.:** Human meniscal transplantation. Preliminary results at 2 to 5-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br*, 77(4): 589-95, 1995.
142. **Verdonk, P.; Beaufils, P.; Bellemans, J.; Djian, P.; Heinrichs, E. L.; Huysse, W.; Laprell, H.; Siebold, R.; and Verdonk, R.:** Successful treatment of painful irreparable partial meniscal defects with a polyurethane scaffold: two-year safety and clinical outcomes. *Am J Sports Med*, 40(4): 844-53.
143. **Verdonk, R., and Kohn, D.:** Harvest and conservation of meniscal allografts. *Scand J Med Sci Sports*, 9(3): 158-9, 1999.
144. **Verdonk, R.; Verdonk, P.; Huysse, W.; Forsyth, R.; and Heinrichs, E. L.:** Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions. *Am J Sports Med*, 39(4): 774-82.
145. **Veth, R. P.; den Heeten, G. J.; Jansen, H. W.; and Nielsen, H. K.:** An experimental study of reconstructive procedures in lesions of the meniscus.

- Use of synovial flaps and carbon fiber implants for artificially made lesions in the meniscus of the rabbit. *Clin Orthop Relat Res*, (181): 250-4, 1983.
146. **Warejcka, D. J.; Harvey, R.; Taylor, B. J.; Young, H. E.; and Lucas, P. A.:** A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. *J Surg Res*, 62(2): 233-42, 1996.
147. **Webber, R. J.:** In vitro culture of meniscal tissue. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 114-20, 1990.
148. **Webber, R. J.; Harris, M. G.; and Hough, A. J., Jr.:** Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res*, 3(1): 36-42, 1985.
149. **Webber, R. J.; York, J. L.; Vanderschilden, J. L.; and Hough, A. J., Jr.:** An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med*, 17(3): 393-400, 1989.
150. **Webber, R. J.; Zitaglio, T.; and Hough, A. J., Jr.:** Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *J Orthop Res*, 6(1): 13-23, 1988.
151. **Weigel, B., and Nerlich, M.:** Praxisbuch Unfallchirurgie. Edited, Heidelberg, Springer Verlag, 2004.
152. **Williams, J. T.; Southerland, S. S.; Souza, J.; Calcutt, A. F.; and Cartledge, R. G.:** Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*, 65(1): 22-6, 1999.
153. **Woo, S. L., and Buckwalter, J. A.:** AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res*, 6(6): 907-31, 1988.
154. **Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; and Black, I. B.:** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61(4): 364-70, 2000.
155. **Wüller, N.:** Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie. Edited, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2010.
156. **Yamasaki, T.; Deie, M.; Shinomiya, R.; Izuta, Y.; Yasunaga, Y.; Yanada, S.; Sharman, P.; and Ochi, M.:** Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal

- stromal cells derived from rat bone marrow. *J Biomed Mater Res A*, 75(1): 23-30, 2005.
157. **Yoo, J. U.; Barthel, T. S.; Nishimura, K.; Solchaga, L.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; and Johnstone, B.:** The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80(12): 1745-57, 1998.
158. **Young, H. E. et al.:** Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 264(1): 51-62, 2001.
159. **Zellner, J. et al.:** Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A*, 94(4): 1150-61.
160. **Zippel, H.:** Meniskusverletzungen und -schäden. Edited, Leipzig, Barth, 1973.
161. **Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; and Hedrick, M. H.:** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2): 211-28, 2001.