

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

**In vivo Angiogeneseverhalten bei Tissue Engineering Produkten zur
Reparatur von Meniskusläsionen am Rückenhautkammermodell der Maus**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Tobias Ehrenreich
aus Landshut**

2013

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

**In vivo Angiogeneseverhalten bei Tissue Engineering Produkten zur
Reparatur von Meniskusläsionen am Rückenhautkammermodell der Maus**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Tobias Ehrenreich

aus Landshut

2013

Dekan:

Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Angele

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung:

04. Februar 2014

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	01
1.1 Anatomie und Funktion des Meniskus	01
1.2 Ätiologie und Klassifikation von Meniskuläsionen	05
1.3 Klassische Therapie von Meniskuläsionen	06
1.4 Therapie von Meniskuläsionen mittels Tissue Engineering	11
1.5 Rückenhautkammermodell und Intravitalmikroskopie	14
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Arzneimittel	16
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.3 Kits	17
2.1.4 Verbrauchsmaterial	17
2.1.5 Geräte	18
2.1.6 Antikörper und Enzyme	19
2.1.7 Puffer und Lösungen	19
2.1.8 Medien, Medienzusätze und Seren	20
2.1.9 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren	21
2.1.10 Biomaterialien	21
2.1.11 Zellmaterial	22
2.1.12 Tiere	22
2.1.13 Intravitalmikroskopie	23

2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellbiologische Methoden und Zellherkunft	24
2.2.1.1 Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen	24
2.2.1.2 Zellkultur von Meniskuszellen	25
2.2.1.3 Besetzen der Scaffolds mit mesenchymalen Zellen bzw. Meniskuszellen	26
2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl	27
2.2.2 Herstellung von Meniskuspellets und Meniskusringen	28
2.2.2.1 Meniskuspellets	28
2.2.2.2 Meniskusringe	28
2.2.3 Angiogeneseuntersuchungen	29
2.2.3.1 Modell Intravitalmikroskopie	29
2.2.3.2 Tiere	29
2.2.3.3 Operationstechnik	29
2.2.3.4 Versuchsaufbau	30
2.2.3.4.1 Meniskuspellets	31
2.2.3.4.2 Meniskusringversuche	31
2.2.3.4.2.1 Leerdefekt	32
2.2.3.4.2.2 Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte	32
2.2.3.5 Gefäßdichtebestimmung	32
2.2.3.6 Gefäßfunktionabilitätsbestimmung	33
2.2.3.6.1 Fluoreszenzfärbung von Mäuseerythrozyten	33
2.2.3.6.2 Detektion und Dokumentation	33
2.2.4 Histologische Methoden	34
2.2.4.1 Gewebepvorbereitung	34
2.2.4.2 Toluidinblaufärbung	34
2.2.4.3 Peroxidasenachweis	35
2.2.4.4 Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit	35

2.2.5	Immunhistochemisches Verfahren	36
2.2.5.1	Endostatinnachweis	37
2.2.6	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Mittlere vaskuläre Dichte	38
3.2	Histologischer Angiogenesenachweis	55
3.3	Gefäßfunktionabilität	60
3.4.	Histologischer Endostatinnachweis	63
3.5	Histologischer Integrationsnachweis	66
3.6	Differenzierungsverhalten	67
3.7	Zellviabilität	69
4	Diskussion	72
5	Literatur	77
6	Anhang	84
6.1	Lebenslauf	84
6.2	Danksagung	84

1 Einleitung

Ein steigendes Freizeitangebot mit dem Trend zu immer neueren Extrem- und Risikosportarten [1, 2], oftmals in Kombination mit aggressiver Werbung der Sportartikelhersteller [3-5], hat in den letzten Jahren zu einer deutlich gesteigerten Risikobereitschaft der Sporttreibenden bei oft gleichzeitig bestehendem inadäquatem Trainingszustand geführt [1]. In zunehmendem Maße sind das Kniegelenk und insbesondere die Menisken vermehrten Belastungen und Verletzungen ausgesetzt [6].

Dabei stellen gerade Meniskusverletzungen ein großes therapeutisches Problem dar. Insbesondere avaskuläre Meniskusläsionen, welche 70% aller meniskalen Verletzungen ausmachen [7], werden aktuell üblich mittels partieller Meniskektomie behandelt [8]. Dabei erfährt das Kniegelenk bereits bei partieller Resektion eine Reduktion der schützenden Pufferfunktion. Die biomechanischen Verhältnisse werden verändert und es kommt zu einer erhöhten Belastung des angrenzenden Knorpels und den umliegenden Weichteilen [9, 10]. Bereits eine Meniskusresektion zwischen 15 und 34% der ursprünglichen Größe führt zu einer Kontaktdrucksteigerung auf den Gelenkknorpel um mehr als 350% [11]. Langfristig folgt eine irreversible, degenerative Schädigung des betroffenen Kniegelenks bis hin zu einer frühzeitigen Gonarthrose [12].

Neben den damit verbundenen individuellen Einschränkungen der Lebensqualität verursachen Meniskusläsionen auch einen enormen volkswirtschaftlichen Schaden [6, 13, 14]. Die arthroskopische Meniskusteilresektion stellt heute die mit am häufigsten durchgeführte Operation in Deutschland dar [14].

1.1 Anatomie und Funktion des Meniskus [15-17]

Menisken sind faserige, konkave Scheiben, die Scher- und Translationskräfte puffern und die Stabilität im Kniegelenk erhöhen. Das Kniegelenk, ein Drehschaniergelenk, ist das größte Gelenk des Körpers. Es artikulieren die in Seitenansicht spiralig konturierten Femurkondylen mit den flacheren Tibiakondylen. Daher kommt in Streckstellung ein umfangreicherer Knochenkontakt zustande als in Beugstellung. Zur Sicherung der Führung und Gewährleistung der Stabilität in diesem von der Knochenanatomie her inkongruenten Gelenk sind zwischen Femur und Tibia die Menisken als transportable Gelenkpfannen eingelagert. Die Menisken sind in Aufsicht c-förmige Faserringe. Ihre äußeren Ränder messen ca. 1,5 cm und verjüngen sich zum Gelenkzentrum hin, so dass sie einen keilförmigen Querschnitt

aufweisen. Die Oberfläche der Menisken korreliert zur konvexen Form der Femurkondylen und ist dementsprechend konkav ausgemuldet. Die Unterfläche ist hingegen flach und liegt dem ebenfalls planen Tibiaplateau auf.

Während die Knochen bei anderen Gelenken zumeist ineinander passen, berühren sich Femur und Tibia im Kniegelenk nur punktuell im Gelenkzentrum. Peripher ruhen die Femurkondylen auf den Menisken. Bei Bewegungen im Kniegelenk schlittern die Femurkondylen in einer Rollgleitbewegung über die Tibiagelenkfläche und schieben die Menisken vor sich her: bei Beugung nach hinten und bei Streckung nach vorne.

Beide Menisken sind mit ihren Enden an der Area intercondylaris, sowie an der Gelenkkapsel befestigt. Der c-förmige Innenmeniskus ist größer als der Außenmeniskus. Im Vorderhornbereich setzt er in der vorderen interkondylären Fossa direkt anterior der Insertionstelle des vorderen Kreuzbands am Tibiaplateau an, im Hinterhornbereich ist er in der Fossa intercondylaris zwischen der Insertion des hinteren Kreuzbands und der Insertion des Außenmeniskus verankert. Der Innenmeniskus ist auch fest mit der medialen Gelenkkapsel verbunden. Anders als der Außenmeniskus und das laterale Seitenband ist die Pars intermedia des medialen Meniskus über ligamentäre Fasern mit dem Ligamentum collaterale mediale verwachsen. Aufgrund dieser stärkeren Fesselung legt der Innenmeniskus bei Beugung eine kleinere Strecke zurück als der äußere. Bei Außenrotation im Kniegelenk wird er am stärksten verlagert, bei Innenrotation entlastet.

Der nahezu ringförmige Außenmeniskus nimmt eine größere Fläche auf dem Tibiaplateau ein als der Innenmeniskus. Sein Vorderhorn setzt an der Eminentia intercondylaris direkt hinter der Insertion des vorderen Kreuzbands an, sein Hinterhorn ist vor dem des Innenmeniskus auf der tibialen Oberfläche verankert. Zusätzlich können Innen- und Außenmeniskus durch das Ligamentum transversum genus, einem Querband im Vorderhornbereich, verbunden sein. Der Außenmeniskus besitzt keine Verbindung zum Ligamentum collaterale laterale, allerdings variabel ausgebildete femorale Befestigungen in Form der sogenannten Humphrey- und Wrisberg-Ligamente.

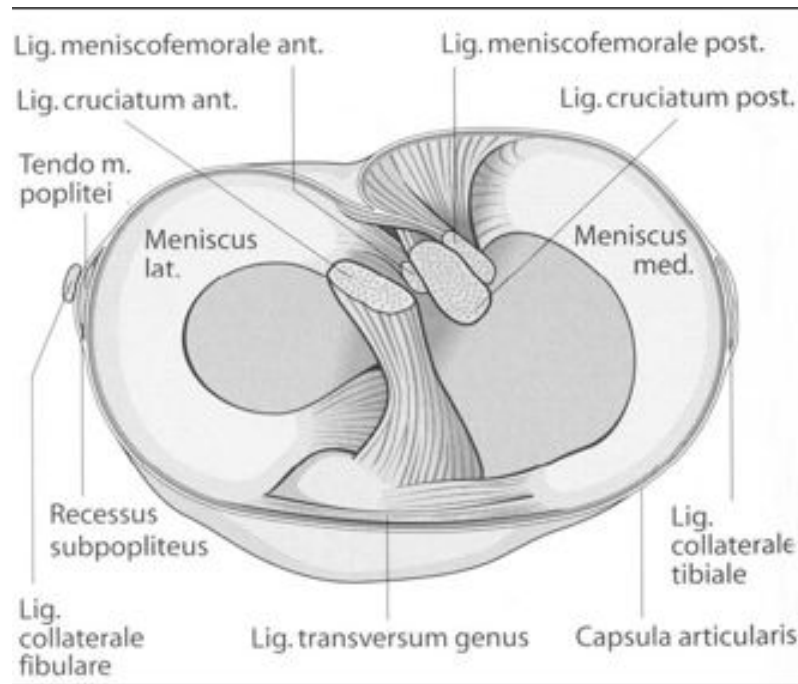


Abbildung 1.1: Horizontalschnitt durch das Kniegelenk proximal der Meniskusebene [12].

Der humane meniskale Faserknorpel zeichnet sich durch seine dichten, längsverlaufenden Kollagenfaserbündel zumeist vom Typ I (ca. 90%) aus, zwischen denen einzelne Knorpelzellen oder kleine isogene Chondrozytengruppen mit umgebendem Knorpelhof liegen. Die strukturelle Rigidität der Menisken wird durch wenige, radiär und quer zur zentralen freien Spitze hin verlaufende Fasern verstärkt.

Die Blutversorgung der Menisken erfolgt aus den oberen und unteren Ästen der lateralen und medialen Aa. geniculares. Diese Gefäße vereinigen sich an der Basis der Menisken zu einem perimeniskalen kapillären Plexus. Während bei Kindern im ersten Lebensjahr noch der gesamte Meniskus vaskularisiert ist, finden sich bereits im zweiten Lebensjahrzehnt nur noch im äußeren Drittel Blutgefäße, Tendenz sinkend [17, 18]. Kleinere radiäre Äste versorgen ca. 20-30% der basisnahen Gesamtmasse des Innenmeniskus und 10-25% des Außenmeniskus. Da die zentralen Bereiche der Menisken avaskulär sind, muss hier die Versorgung durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit erfolgen.

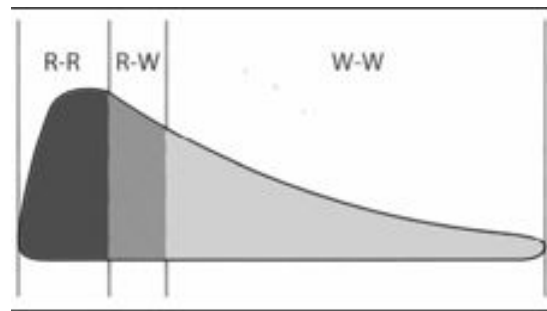


Abbildung 1.2.: Schematische Ansicht der Gefäßversorgung eines Meniskus. R-R entspricht der gut vaskularisierten rot-roten Zone im Gegensatz zur nicht durchbluteten weiß-weißen Zone (W-W). R-W stellt die intermediär gelegene Übergangszone dar [12].

Die Menisken haben einen wichtigen Anteil an der komplexen Knie-Biomechanik. Klinische und experimentelle Studien konnten die funktionelle Bedeutung der Menisken analysieren. Sowohl Kraftverteilung, Schockabsorption, Kniestabilität, Lubrikation als auch Propriozeption konnten als wichtige Eigenschaften den Menisken zugeordnet werden.

Kraftverteilung: Menisken, aber auch Gelenkknorpel, federn jede auf das Kniegelenk einwirkende Belastung ab. Zum einen werden axial einwirkende Kräfte in eine Ringspannung umgelenkt, andererseits erfährt der Gelenkknorpel durch die Menisken einen zusätzlichen Schutz. Dadurch dass sie die Kongruenz im Kniegelenk verbessern und damit die einwirkende Kraft auf eine größere Oberfläche verteilen, bewirken sie eine Entlastung des Gelenkknorpels [19-22].

Stoßabsorption: Die Menisken besitzen aufgrund ihres oben beschriebenen anatomischen Aufbaus ausgeprägte viskoelastische Eigenschaften. Auf das Kniegelenk einwirkende Kräfte können durch Verformung der Menisken abgepuffert werden [23-25].

Gelenkstabilität: Die Menisken fungieren als sekundäre Stabilisatoren des Knies. Die Schubladenbewegung nach vorderer Kreuzbandruptur ist bei intaktem Innenmeniskus deutlich geringer ausgeprägt [26-29].

Gleitfähigkeit und Knorpelernährung: Wie bereits oben angesprochen gleiten die Menisken bei Beugung und Streckung im Kniegelenk. Mitgeführte Synovialflüssigkeit verbessert dabei die Gleitfähigkeit der Gelenkflächen. Außerdem gewährleistet die Durchwalkung auch eine ausreichende Knorpelernährung [30].

Propriozeption: Menisken enthalten Nervenendigungen. Vermutlich durch Rückmeldung der Kniestellung an höher gelegene Zentren leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Statik [31, 32].

1.2 Ätiologie und Klassifikation von Meniskusläsionen

Frische Meniskusverletzungen entstehen nur bei großer Krafteinwirkung, beispielsweise im Rahmen eines Verdrehtraumas oder bei Bandrupturen. Davon betroffen sind meist Sportler. Besondere Risikosportarten für Meniskusverletzungen sind unter anderem Fußball, Skifahren, Handball, Tennis, Volleyball, Kampfsportarten wie Judo, Karate oder Ringen und, oft unfallbedingt, Radsport [6, 12].

Häufiger reißen vorgeschädigte Menisken bei so genannten Bagatelltraumata. Davon sind ältere Menschen betroffen, deren Tätigkeit zu einer degenerativen Vorschädigung der Knie führt, so zum Beispiel der langjährige Beruf als Fliesenleger. Ein Kniegelenkserguss, schmerzhaftes Bewegungseinschränkungen bis hin zu Einklemmungserscheinungen und Streckhemmung können die Folge sein [12].

Nach erfolgten Erstmaßnahmen, die neben einer sofortigen Belastungsreduktion auch Ruhigstellung und Kühlung beinhalten, sollte bei konkretem Verdacht eine entsprechende Diagnostik erfolgen. Das Diagnostikum der Wahl ist neben den klinischen Tests, die jedoch stark patienten- und untersucherabhängig sind, die Kernspintomographie. Ausmaß und Lokalisation können damit in der Mehrzahl der Fälle erkannt werden. Basisnah gelegene Läsionen sind unter Umständen auch der Sonographie zugänglich.

Die Einteilung von Meniskusverletzungen erfolgt nach ihrer Lokalisation (Innen- oder Außenmeniskus; Vorderhorn, Pars intermedia, Hinterhorn) und nach morphologischen Kriterien [12]. Dabei unterscheidet man:

- a) Längsrisse: Longitudinale Meniskusrupturen können entweder komplett oder inkomplett ausgebildet sein. Der inkomplette, längsverlaufende Riss hat nur Kontakt zu einer Meniskusfläche. Die Prädilektionsstelle ist das Hinterhorn. Komplette Längsrupturen betreffen Unter- und Oberfläche des Meniskus, sodass sich ein Lappen bildet.
- b) Korbhenkelrisse: Korbhenkelriss ist die Bezeichnung für einen parallel zur Haupttrichtung der Fasern verlaufenden Meniskusriss. Der Meniskus wird dabei entlang seines Verlaufs längs gespalten, das vordere und hintere Ende des Fragments behält weiterhin Verbindung zum Rest des Meniskus. Der zentral gelegene Anteil des Meniskus, der den stabilen Anschluss zur Meniskusbasis verloren hat, kann korbhenkelartig in die Gelenkrichtung luxieren und die Beweglichkeit des Gelenks blockieren.
- c) Radiärrisse: Radiäre Rupturen ziehen vom zentralen freien Meniskusrand nach peripher Richtung Basis.

d) Lappenrisse: Bei einem Lappenriss reißt der Meniskus quer und längs im Vorder- oder Hinterhorn ein. Es entsteht eine Art Lappen.

e) Horizontalrisse: Horizontale Rupturen bilden sich nahe der Meniskusbasis und vergrößern sich parallel zur Oberfläche bis sie den freien Meniskusrand erreichen.

Eine Kombination mindestens zweier Rissformen wird als komplexer Riss bezeichnet.

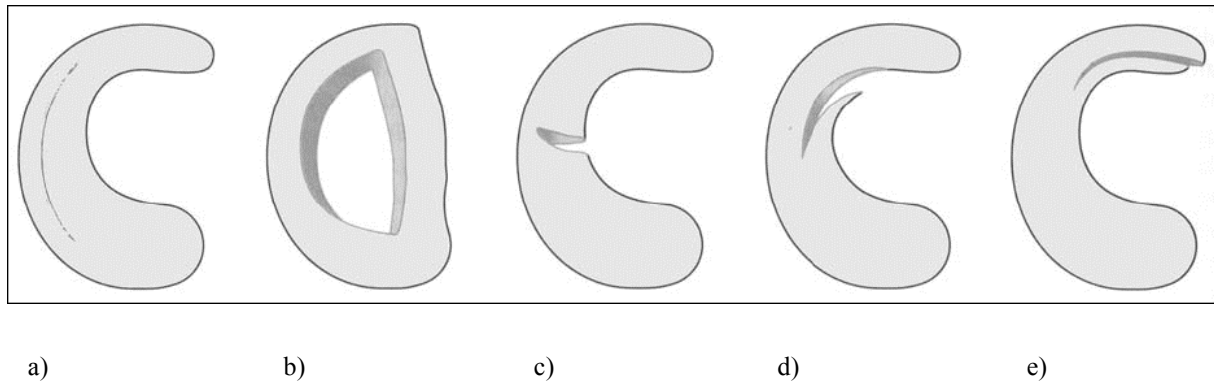


Abbildung 1.3: Darstellung verschiedener Meniskusrisstypen [12]:

a: Längsriss, b: Korbhenkelriss, c: Radiärriss, d: Lappenriss, e: Horizontalriss

1.3 Klassische Therapie von Meniskusläsionen

Zur Therapie einer Meniskusverletzung können verschiedene Optionen in Erwägung gezogen werden. Dabei sind neben der Art des Schadens und der Lokalisation des Risses auch die individuellen Begebenheiten wie Alter sowie berufliche und/oder sportliche Ambitionen ausschlaggebend. Jedoch immer steht die gering ausgeprägte Selbstheilungstendenz der Menisken im Vordergrund. Diese wird durch die Gefäßanatomie bestimmt. Die peripheren Meniskusanteile (20-30%) sind über radiär angeordnete Kapillaräste an die Gefäßversorgung angeschlossen, während die avaskulären, zentralen Anteile durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit versorgt werden [33].

Während Risse in rein avaskulären Meniskuszonen kein endogenes Reparaturpotential aufweisen, ist bei Mitverletzung vaskularisierter Zonen eine endogene Meniskusregeneration möglich [33-35].

Da man die Bedeutung der Menisken lange Zeit verkannte, wurden Meniskusrisse bis in die siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts durch komplette Resektion des betroffenen Meniskus behandelt. Jedoch konnte Fairbank bereits 1948 radiologische Veränderungen im Kniegelenk

nach erfolgter, kompletter Meniskektomie beobachten [36].

Die frühzeitige Entwicklung einer Gonarthrose als Folge einer Meniskusresektion wurde erkannt. Der partielle oder vollständige Verlust des Meniskus beeinflusst nachhaltig die Funktion des Kniegelenks und prädisponiert es für eine degenerative Schädigung [9, 10, 24, 36]. Die Hauptfolgen sind Gelenkspaltverschmälerung, Abflachung der Femurkondylen und die Ausbildung von Osteophyten [36-38]. Als Hauptursache für das Auftreten der Kniegelenksarthrose wird hierbei die Reduktion der schützenden Meniskus-Pufferfunktion angenommen, die konsekutiv mit einer erhöhten Druckbelastung auf den Gelenkknorpel verbunden ist [9, 10].

Heute weiß man, dass eine Meniskektomie nicht in jedem Fall angezeigt ist. Es erfolgte ein Paradigmenwechsel in der Behandlungsstrategie von Meniskusverletzungen. Unter Berücksichtigung des gegenwärtig gültigen Verständnisses der Menisken und ihrer biomechanischen Funktion versucht man derzeit möglichst viel originäre, unverletzte Meniskussubstanz zu erhalten.

Unter Berücksichtigung der individuellen Gegebenheiten stehen mehrere Therapieformen zur Verfügung. Aufgrund der bereits erwähnten, geringen Selbstheilungstendenz ist nur in Ausnahmefällen eine konservative Versorgung möglich. Einzig bei einer kleinen Läsion in der gut vaskularisierten rot-roten Zone steht ein konservativer Therapieversuch mittels Ruhigstellung zur Verfügung, der allerdings häufig wenig Erfolg versprechend ist. Meniskusdefekte der vaskularisierten Zone haben eine gewisse Reparaturtendenz. Mögliche Reparaturzellen in Form mesenchymaler Vorläuferzellen sollen dabei aus der umgebenden Synovia bzw. dem Gefäßsystem [33-35, 39] bei Anschluss des Meniskusdefekts an die Gefäßversorgung in das Defektareal gelangen können. Zur Regeneration eines Defekts mit meniskusähnlicher Morphologie müssen diese Zellen dann jedoch noch unter bestimmten Milieubedingungen zu Fibrochondrozyten differenzieren, um eine meniskustypische Kollagen I- und II-haltige Matrix produzieren zu können [40-42]. Dies ist durch rein endogene Reparaturmechanismen im vaskulären Anteil kaum und im avaskulären Bereich nicht erreichbar.

Therapie der Wahl ist stattdessen die Operation. Die Eingriffe werden heute ganz überwiegend arthroskopisch durchgeführt.

Im so genannten Needling-Verfahren (Trephination) werden bei Meniskusrissen in der

avaskulären Zone mit einer Nadel Trephinationskanäle in die Meniskusbasis gesetzt, um eine Verbindung vom avaskulär gelegenen Meniskusriss zur Meniskusbildung zu schaffen. Analog zu Reparaturmechanismen anderer Gewebe des Stütz- und Bewegungsapparates wird dadurch das Einwandern von Entzündungszellen und eine anschließende Einsprossung von Gefäßen in das Rupturgebiet erleichtert. Es kommt zur Ausbildung von narbigem Ersatzgewebe. In einigen Fällen führt das Remodelling auch zur Entstehung von meniskusähnlichem Gewebe. Mesenchymale Progenitorzellen sollen nach Einwandern via Gefäßsystem bzw. Synovia und anschließender Differenzierung zu Fibrochondrozyten eine Regeneration mit meniskusähnlichem Gewebe ermöglichen. In experimentellen Studien zeigten mit Trephination behandelte Meniskusrisse im Vergleich zur unbehandelten Gruppe eine höhere Heilungsrate [43-45]. In der Klinik hat sich diese Technik vor allem bei inkompletten oder stabilen Meniskusrissen, bzw. als Ergänzung zu verschiedenen Nahttechniken bewährt.

Aufgrund dieser gering ausgeprägten Selbstheilungstendenz ist nach dem heutigen Stand der Dinge für Meniskusküsläsionen im avaskulären, weiß-weißen Bereich die partielle bzw. subtotale Meniskektomie nach wie vor Therapie der ersten Wahl. Auch ältere degenerative Rupturen sind meist keiner anderen Therapieform zugänglich. Dabei werden die abgerissenen Anteile soweit abgetragen, dass eine stabile und möglichst glatte Restbasis verbleibt. In die Gelenkrichtung luxierte Gewebeteile werden ebenfalls entfernt. Es gilt der Grundsatz: „So viel wie nötig, so wenig wie möglich“ zu reseziieren. Heute stellt die arthroskopische Meniskusteilresektion die mit am häufigsten durchgeführte Operation in Deutschland dar [14].

Bei Rissen im basisnahen, rot-roten Bereich sollte zunächst eine Refixation erfolgen. Auch in der „rot-weißen“ Übergangszone ist damit eine Heilung möglich. Die Fixierung kann dabei durch Meniskusnaht erfolgen.

Vor einer Versorgung sollten die Wundränder des bradytrophen Gewebes zunächst mit dem Ziel einer verbesserten Regeneration mittels Shaving und Needling angefrischt werden [46, 47].

Operative Nahttechniken sind dabei die arthroskopische Outside-in-Technik [48-50] bzw. Inside-out-Technik [51, 52] bei Verletzungen im Bereich des Vorderhorns bzw. der Pars

intermedia. Hinterhornrisse oder Korbhenkelrisse werden häufig mittels All-inside-Technik [53, 54] therapiert. Eine Verkürzung der Operationsdauer sowie geringere Anforderungen an die manuellen Fertigkeiten des Operateurs sind Vorteile der auf dem Markt erhältlichen all-inside Reparaturkomplettsysteme [55]. Als Nahtmaterial dient meist resorbierbarer Faden der Stärke 2/0, insbesondere auf Polyethylen basierendes Nahtmaterial zeichnet sich durch erhöhte Festigkeit aus [56]. Bei stabilem Bandapparat sind hiermit Heilungsraten zwischen 50-75% möglich [57], mit einem Abfall über die Zeit [55].

Der operationstechnisch anspruchsvolleren und zeitaufwendigeren Naht stehen andere Versorgungstechniken zur Verfügung. Die sogenannte Meniskusnagelung erfolgt mittels biodegradabler Implantate in Form von Schrauben, Dübeln oder Pfeilen [58-60]. Diese weisen jedoch im Gegensatz zur Naht eine höhere Tendenz zur Dislokation und zum Ausreißen auf. Aufgrund eines konstruktionsbedingten Implantatkopfes, einer ungenügenden Versenkung im Meniskusgewebe und/oder wegen des langsamen Resorptionsverhaltens können die voluminösen Materialien die Entwicklung von Knorpelschäden an den angrenzenden Gelenkflächen verursachen [61-66]. Bei anfänglich guter Heilungstendenz [67, 68] liefern die biodegradablen Implantate langfristig teilweise schlechtere Ergebnisse. Aufgrund geringerer Stabilität können Rerupturen folgen [68, 69]. Ishimura et al. verwenden seit Mitte der 1980er Jahre Fibrinkleber [70], jedoch konnte im avaskulären Defekmodell nur eine unvollständige Defektfüllung erzielt werden [71]. Fibrin- und auf photochemischer Reaktion beruhende Kleber können einen positiven Beitrag vor allem während der anfänglichen Anhaftungsphase leisten, sie stellen jedoch keine echte Alternative dar [72, 73].

Neben den genannten Techniken zur Meniskusregeneration gab und gibt es auch die Möglichkeit zum Ersatz des nativen, stark geschädigten Meniskus mittels Transplantation. Zur Wiederherstellung der nach Meniskektomie eingetretenen, gestörten Kniebiomechanik wurden sowohl autologe als auch allogene Meniskustransplantate verwendet.

Als autologes Material diente fibröses Gewebe, dass vom Knie-Fettkörper (Hoffa) oder von Ligamenten des Patienten entnommen und anschließend eingenäht wurde [74-77]. Die Transplantate konnten jedoch kein meniskusähnliches Gewebe erzeugen und/oder dieses gleichwertig ersetzen. Für das Implantatversagen wurde ein zu langsamer oder inkompletter Anschluss an das Gefäßsystem ebenso wie eine inadäquate Fixierung und/oder Stabilisierung vermutet [78]. Stone et al. spekulierten trotz körpereigener Transplantation auch über mögliche Abstossungsvorgänge [78]. Die Folge war eine reduzierte Kniestabilität und das

Auftreten von arthrotischen Veränderungen. Nach derzeitigen Erkenntnissen muss daher von autologen Transplantaten abgeraten werden [42, 74].

In verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien wurden auch allogene Meniskus-Transplantate eingesetzt. Mismatch in der Transplantatgröße, Transplantatschrumpfung im zeitlichen Verlauf, Transplantat-Abstoßungen, sowie die Gefahr der möglichen Übertragung von Krankheiten schränken deren Einsatz jedoch stark ein [78-88]. Kleine Fallzahlen, die aufgrund der Art und des Ausmaßes der Verletzung, der Indikationsstellung, der Art der operativen und Begleitversorgung, des Alters, des Gewichts und Geschlechts sehr heterogenen Patientengruppen, sowie das Fehlen von Kontrollgruppen erschweren die Interpretation der bislang vorliegenden Daten. Eine niedrige Evidenzklasse ist den Studien gemein [81]. Des Weiteren findet sich häufig eine Diskrepanz zwischen postoperativer Klinik und radiologischer Verlaufsuntersuchung mit immunogen bedingter, langsamer Gewebeerstörung [81, 89]. Tiefgekühlte scheinen gegenüber lyophilisierten Transplantaten aufgrund geringerer Schrumpfungstendenz von Vorteil zu sein [77, 87], wohingegen insbesondere bestrahlte Menisken für ein Therapieversagen verantwortlich zu machen sind [90]. Die knöcherne Meniskusverankerung liefert über die Zeit wohl ebenso bessere Ergebnisse als alleinige Naht [91]. Noyes und Kollegen postulierten die rechtzeitige, also noch vor Arthrosebeginn durchgeführte Operation zur Vermeidung eines Transplantatversagens [88, 92]. Verdonk et al. berichteten von einer anhaltenden Schmerzerleichterung und Verbesserung der Kniefunktion nach einem mittleren Beobachtungszeitraum von 7,2 postoperativen Jahren in einer ebenfalls inhomogenen, aber mit 100 Patienten noch vergleichsweise großen Gruppe. Allerdings kam es auch hier zu einem Therapieversagen in 21 Fällen [89, 93]. Die mittels Transplantation oftmals erreichte Schmerzlinderung und funktionelle Verbesserung darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass doch erhebliche Behinderungen im Alltag und bei sportlicher Betätigung fortbestehen [89]. Bei hohem Therapieversagen und der schlechten Verfügbarkeit von allogenen Transplantaten in Europa stellt die Meniskustransplantation in Deutschland derzeit kein zufriedenstellendes Therapieverfahren dar. Dennoch leisten die daraus bereits erhaltenen und die in weiter durchzuführenden Langzeitstudien hervorgehenden Daten Erkenntnisse hinsichtlich dem optimalen Einsatz von neuartigen Meniskusersatzverfahren.

1.4 Therapie von Meniskusläsionen mittels Tissue Engineering

Neben den bisher aufgeführten Techniken besteht des Weiteren die Möglichkeit zur Regeneration von Meniskusläsionen mittels Tissue Engineering.

Aufgrund der bereits angesprochenen, begrenzten endogenen Reparaturfähigkeit wurden verschiedene Behandlungskonzepte und unterschiedliche Ersatzmaterialien zur Reparatur von Meniskusdefekten eingesetzt:

Im Tierexperiment wurde die Verwendung von einzelnen Zellen und Zellverbänden ohne Trägermaterial untersucht. Ein in einen avaskulären Meniskusdefekt eingebrachtes Fibringerinnsel führte zu einer Defektfüllung mit fibroartilaginärem Ersatzgewebe, welches sich jedoch optisch und funktionell stark vom Meniskusgewebe unterschied [94, 95]. Die additive Verwendung eines Fibringerinnsels zur Meniskusnaht brachte demnach ebenso wenig einen Vorteil bezüglich der Reparatur eines Meniskuseinrisses in der avaskulären Zone [95], wie eine weitere Zugabe von kultivierten Knochenmarkzellen zum Fibringerinnsel ebenfalls keinen Benefit ergab [95].

Auch synthetische Ersatzmaterialien wurden entwickelt und eingesetzt. Zunächst wurden nicht resorbierbare, synthetische Polymere für die Meniskusreparatur verwendet. Diese waren zumeist von fester Beschaffenheit. Allerdings konnten diese Konstrukte die biomechanischen Eigenschaften des nativen Meniskus nicht annähernd imitieren und damit ebenfalls eine konsekutive Gelenkzerstörung nicht verhindern [96-98].

In einen Defekt eingebrachte, degradable und poröse Polyurethane erbrachten demgegenüber einen verbesserten Heilungserfolg [40-42, 99]. Dabei soll die hohe Porosität des eingebrachten Materials das Einwachsen von Gefäßen mit konsekutiver, fibroartilaginärer Differenzierung von Reparaturzellen ermöglichen, während hingegen leer gebliebene Kontrolldefekte nur mit fibrösem Ersatzgewebe aufgefüllt würden [40, 41]. Diese zelluläre Differenzierung konnte nach mehr als 20 Wochen beobachtet werden, wohingegen das degradable Implantat eine Halbwertszeit von mehr als einem Jahr besaß [41, 99]. Actifit® wird seit kurzem in klinischen Studien eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein poröses Scaffold aus Polyurethan, das auf zahlreichen Untersuchungen der Forschungsgruppe aus Nijmegen basiert [40-42, 100, 101]. Die Ergebnisse der laufenden Studien sind abzuwarten.

Weiter wurden natürliche Polymere mit einer verbesserten Biokompatibilität und Degradabilität entwickelt. Weitere Bestrebungen führten zur Entwicklung von Konstrukten,

welche die Bestandteile der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen und Glykosaminoglykane, besser zu imitieren versuchten. Mit Glutaraldehyd stabilisierte Implantate auf Kollagenbasis zeigten in vitro das Einwachsen von Fibrochondrozyten aus dem umgebenden Meniskus in diese Biomaterialien [86] sowie eine Meniskusregeneration in vivo [85, 102]. Die potentielle Zytotoxizität von Matrixstabilisatoren wie Glutaraldehyd [99, 103] galt es zu beachten. Das von Stone et al. entwickelte Collagen Mensicus Implant®, eine aus bovinen Kollagenfasern hergestellte, biokompatible und degradable Meniskusprothese fand Einzug in klinische Studien [100]. Eine Multicenter-Studie ergab, dass die Verwendung von Collagen Mensicus Implant® die Regeneration unterstützt. Voroperierte Patienten fielen auch durch eine Steigerung ihrer Aktivität auf, wohingegen Patienten mit akuter Verletzung keinen Benefit gegenüber der ohne Implantant versorgten Kontrollgruppe aufwiesen [101, 104].

Auch in der eigenen Abteilung wurde intensiv an der Biomaterialforschung gearbeitet [105-108]. Es entstand ein neues biodegradables Biomaterial mit guter Biokompatibilität und spezifischen biologischen Eigenschaften [109]. Wie beim physiologischen Aufbau der extrazellulären Matrix bilden dabei eine Kombination aus veresterter Hyaluronsäure und Gelatine das Gerüst des schwammartigen Materials. Der verzögerte Abbau der Kompositmatrix nach 2 bis 3 Monaten gewährleistet eine anfängliche Stabilität, die dann im weiteren Verlauf durch entstandenes Reparaturgewebe übernommen werden soll. Frei werdende Degradationsprodukte als physiologische Bestandteile der extrazellulären Matrix sollen die Geweberegeneration unterstützen. Anders als bei den mit Glutaraldehyd stabilisierten Implantaten [99, 103] konnten in Voruntersuchungen mit dieser Kompositmatrix weder Anzeichen von Toxizität noch eine inflammatorische Gewebereaktion beobachtet werden [105, 109, 110].

Ebenso scheinen Hyaluronsäure und Kollagen Typ I, die beiden Matrixbaustoffe, wesentliche Bestandteile der Embryonalentwicklung zu sein. Ein derartig aufgebautes Biomaterial könnte demnach Zellwachstum und –differenzierung in einem ursprünglichen, quasi „embryonalen“ Milieu ermöglichen [111-116].

In vitro Untersuchungen der Kompositmatrix in Kombination mit mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zeigten das Potential dieses Konstrukts auf: nach vierwöchiger Versuchsdauer war das Biomaterial vollständig mit Fibrochondrozyten, die eine massive Kollagen I- und II-haltige extrazelluläre Matrix gebildet hatten, aufgefüllt [109].

Des Weiteren wurden verschiedene Meniskusdefektmodelle entwickelt und in

Tierexperimenten in vivo getestet:

Die in vivo Ergebnisse nach einer kompletten Resektion der Pars intermedia des medialen Meniskus und anschließender Versorgung unterstrichen die in vitro gewonnenen Erkenntnisse. So fand sich bei Therapie mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen die Entwicklung von meniskusähnlichem Reparaturgewebe mit einer typischen Verteilung von Kollagen II zur Meniskusspitze hin. Ebenso konnte der Arthroseprozess am Tibiaplateau aufgehalten werden, der sich sowohl beim unbehandelten Defekt sowie bei der Therapie mit Matrix allein zeigte. Außerdem fand sich bei diesem Zell-Matrix-Konstrukt keine inflammatorische Reaktion auf oder eine toxische Wirkung durch dieselbige [117].

Meniskusstanzdefekte im rein avaskulären Bereich konnten ebenfalls mit Hilfe von mesenchymalen Stammzellen und einer Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix therapiert werden. Das beste Ergebnis lieferte dabei ein nicht vorkultiviertes Konstrukt aus einer Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix und mesenchymalen Stammzellen. Nach 3 Monaten fand sich hier ein meniskusähnliches und vollständig in den Meniskus integriertes Reparaturgewebe. Ein vorkultiviertes Konstrukt zeigte eine zur Kontrollgruppe (zellfreie Matrix) deutlich verbesserte Heilung, allerdings bei gleichzeitig bestehender, fehlender Integration des Reparaturgewebes in den nativen Meniskus [118].

Zur Optimierung und Analyse dieses Therapiekonzepts wurde weiter versucht die vaskuläre Situation in den mit Zellen besetzten Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices zu klären. Zu diesem Zweck wurden die bereits aus der Tumorforschung bekannten in vivo Modelle der Rückenhautkammer und der Intravitalmikroskopie benutzt (siehe 1.5). Die in vivo Untersuchungen ließen abhängig von der verwendeten Zellart und deren Differenzierungsgrad auf unterschiedliche angiogenetische Eigenschaften schließen. Mit Meniskuszellen besetzte und anschließend in die Rückenhautkammer eingebrachte Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices wiesen unabhängig vom Differenzierungsgrad (ein- bzw. vierzehntägige Vorkultur) Gefäßneubildungen auf. Mit eintägig vorkultivierten mesenchymalen Stammzellen besetzte Konstrukte zeigten eine ähnlich hohe Zahl an neugebildeten Gefäßen, wohingegen in Matrices, die mit vierzehntägig vorkultivierten mesenchymalen Stammzellen beladen waren, eine signifikant geringere Gefäßeinsprossung nachgewiesen werden konnte [119]. Parallel zu diesem in vivo Modell wurde in vitro die Konzentration von VEGF (vascular endothelial cell growth factor), dem wohl bedeutendsten Angiogenesemediator [120], bestimmt. Ein bei mesenchymalen Stammzellen mit zunehmender Vorkulturdauer beobachteter Abfall der VEGF-Konzentration in vitro könnte eine mögliche Erklärung für die in vivo beobachteten

Ergebnisse liefern. Dem gegenüber waren bei Meniskuszellen unabhängig vom Differenzierungsgrad Gefäßneubildungen erkennbar, die VEGF-Konzentration in vitro blieb unverändert hoch [119].

Die Gruppe um Petersen konnte zeigen, dass VEGF eine wichtige Rolle in der Angiogenese von fetalem Meniskus spielt, im Meniskus von Erwachsenen jedoch herunterreguliert wird [121]. Demgegenüber kommt Endostatin, einem Kollagen-Spaltprodukt das in den Signalweg von VEGF eingreift und damit als Gegenspieler fungiert, große Bedeutung in der Entwicklung aber auch Aufrechterhaltung des avaskulären Bereichs innerhalb des Meniskus zu [122].

1.5 Rückenhautkammermodell und Intravitalmikroskopie

Die für diese Arbeit zugrunde liegende Operationstechnik bestand im Anbringen einer Rückenhautkammer (RHK) als intravitales Reaktionssystems. Zur postoperativen Beobachtung und Dokumentation wurde die so genannte Intravitalmikroskopie angewandt.

Die hier verwendete Variante der Rückenhautkammer hat ihre Anfänge in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Sie wurde von Pappenfuss et al. erstmals 1979, sowie weiter von Endrich et al. 1980 beschrieben und seitdem kontinuierlich weiterentwickelt [123, 124].

Die Mikroskopie des Kammerinhalts wurde dabei treffend als Intravitalmikroskopie bezeichnet. Aufgrund ihres speziellen Aufbaus ermöglichte die Rückenhautkammer erstmals die mikroskopische in vivo Untersuchung verschiedener Tumoren bezüglich ihrer angiogenetischen Eigenschaften im Durchlicht z.B. Adenokarzinom der Mamma oder Melanom [124-126]. Die quantitativen Untersuchungen beinhalteten hämodynamische und morphologische Parameter der Mikrozirkulation [123].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung des Angiogeneseverhaltens von Gefäßen in Meniskuspellets (vaskulär; avaskulär) sowie in unterschiedlich differenzierten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukten. Zu diesem Zweck wurde die ebenfalls für die Tumorforschung entwickelte Rückenhautkammer-Modifikation nach Guba et al. angewandt [127].

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Meniskusläsionen, insbesondere im avaskulären Bereich, stellen ein Problem in der Traumatologie dar. Derzeit einzige klinische Therapieoption ist die partielle Meniskektomie mit dem bisher ungelösten Problem der langfristig folgenden, irreversiblen Schädigung des betroffenen Kniegelenks bis hin zu einer frühzeitigen Gonarthrose [12].

Sowohl die Literatur als auch Erfahrungen in der eigenen Abteilung zeigen die Verwendung von Tissue Engineering Produkten als mögliche Alternative auf. Bislang ließ sich allerdings nur wenig Information darüber finden, inwieweit verschiedene Tissue Engineering Produkte Angiogenese im Meniskusdefektmodell beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher das Angiogeneseverhalten untersucht werden, um Rückschlüsse auf eine suffiziente Reparatur von Meniskusdefekten zu ermöglichen. Folgende Hypothesen sollten getestet werden:

Hypothese 1: Vaskuläre und avaskuläre Meniskusanteile weisen ein unterschiedliches angiogenetisches bzw. angiotaktisches Verhalten auf.

Hypothese 2: Das Angiogeneseverhalten im Rahmen der Reparatur von Meniskusläsionen kann an einem Rückenhautkammermodell untersucht werden.

Hypothese 3: Bei der Reparatur von Meniskusläsionen nimmt die verwendete Zellquelle der Tissue Engineering Produkte Einfluss auf das Angiogeneseverhalten.

Hypothese 4: Der Differenzierungsgrad der Zellen beeinflusst die Angiogenese bei der Regeneration von Meniskusläsionen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Arzneimittel

Atropinsulfat		Braun, Melsungen
Bepanthen	Augen- und Nasensalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
	Wund- und Heilsalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
Heparin-Natrium	Liquemin N 25000	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ketaminhydrochlorid	Ketamin 10%	WDT, Garbsen
NaCl-Lösung (isoton)		Braun, Melsungen
Pentobarbital-Natrium	Narcoren	Merial, Hallbergmoos
Xylazinhydrochlorid	Xylazin 2%	CP Pharma, Burgdorf

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Chromalaun	Sigma Aldrich, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$)	Merck, Darmstadt
Cobaltchlorid ($CoCl_2$)	Sigma Aldrich, Steinheim
Diaminobenzidin 0,5% (DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
DePex	Serva, Heidelberg
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$)	Merck, Darmstadt
D-PBS	Gibco, Karlsruhe
Ethanol (C_2H_5OH)	Merck, Darmstadt
Gelatine von Porcine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutardialdehyd 25% ($C_5H_8O_2$)	Roth, Karlsruhe
Hepes 1M	Gibco, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol: $CH_3CH(OH)CH_3$)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$)	Merck, Darmstadt
Methanol (C_1H_3OH)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \times H_2O$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid ($NiCl_2$)	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
Penicilin-Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Phenylhydrazin ($C_6H_5NHNH_2$)	Sigma Aldrich, Steinheim
D(+)-Saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
Toluidin Blau O	Sigma Aldrich, Steinheim

TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Tyrodessalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Merck, Darmstadt

2.1.3 Kits

ABC-Kit	Vectorlabs, Grünberg
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells	Molecular Probes, Eugene, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Abdeckplatte	127x85x11 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Biopsiestanze	Ø2 mm	Stiefel, Offenbach am Main
Cell Strainer	(70 µm)	BD Falcon, Heidelberg
Combi-Stopper		Braun, Melsungen
Deckgläser	24x24/24x32 mm	Roth, Karlsruhe
Desinfektionsmittel	2-Propanol 70%	Baun, Melsungen
	Cutasept F	Bode, Hamburg
Faden	Prolene 4-0	Ethicon, Norderstedt
	Vicryl 3-0	Ethicon, Norderstedt
Kanülen	(18/20/27 G)	BD Falcon, Heidelberg
Kompressen	7,5x7,5cm	Hartmann, Heidenheim
Lochtücher	Foliodrape	Hartmann, Heidenheim
Objektträger	Starfrost adhäsiv	Knittel, Braunschweig
Pflaster	Durapore, 1,25 cm x 5,0 m	3M Medica, Neuss
Pipetten Costar Stripette	(1/5/10/25/50 ml)	Corning, Corning USA
Pipettensets	(10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen epTips filter	(10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Q-Tips		Hartmann, Heidenheim
Rasierklingen	Personna	American Saftey Razor Company, Verona, USA
	GEM	GEM Scientific, USA
Reagiergefäße	Microtubes 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	(11/22)	Feather Safety Razor Co., Osaka Japan
Spritze (5/10ml)		BD Falcon, Heidelberg
Tupfer	Pagasling	Hartmann, Heidenheim
	Sugi	Kettenbach, Eschenburg
Zellkulturflaschen		Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Multiwell (6/12)	BD Falcon, Heidelberg

2.1.5 Geräte

Autoklav	Melatronic 23	Melag, Berlin
Brutschrank	Heracell 240	Heraeus, Hanau
Digitalkamera	Nikon Digital Sight DS-SMC Sony 3CCD Color Video Camera MC3254	Nikon, Düsseldorf Sony, Köln
Färbekammer	Coverplates	Thermo Shandon, Frankfurt a. M.
Heizplatte	Monotherm	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
HF-Chirurgiegerät	Erbotom Bipolar B Radiotom 904	Erbe, Tübingen Siemens, München
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	Zeiss, Jena
Kryostat	HM 500 OM	Microm, Berlin
Küvetten		Roth, Karlsruhe
Mikroskope	Nikon Eclipse TE 2000-U Axiotech Vario	Nikon, Düsseldorf Zeiss, Jena
Fluoreszenz	Zeiss HBO 100	Zeiss, Jena
Invert	Fluovort FU	Leitz, Wetzlar
Tier-OP	Leica M 651	Leica, Solms
Neubauer Zählkammer		Marienfeld, Lauda-Königshofen
OP-Besteck		Aesculap Braun, Melsungen
pH-Meter	pH 315	WTW, Weilheim
Pipetierhilfe	Falcon Express Pipetboy acu Pipetus Akku	BD Falcon, Heidelberg Integra Biosciences, Fernwald Hirschmann, Eberstadt
Precision Brain Slicer	RBM 4000 C	ASI Instruments, Houston, USA
Sicherheitswerkbank	HeraSafe HSP	Heraeus, Hanau
SVHS Video Recorder	MD 835	Panasonic, Hamburg
Taumler	IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik, Staufen
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbäder		GFL, Burgwedel Köttermann, Hänigsen
Waagen	Analysenwaage Kern 770 Präzisionswaage EW Präzisionswaage LC 620 P	Kern, Balingen-Frommern Kern, Balingen-Frommern Sartorius, Göttingen
Wärmeplatte		Shor-Line, Kansas City, USA
Wärmeschrank	UT6	Heraeus, Hanau
Wippe		Eigenbau, Werkstatt
Zentrifugen	Combi-Spin FVL 2400 Multifuge 3S-R	Kisker, Steinfurt Heraeus, Hanau

2.1.6 Antikörper und Enzyme

Collagenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxyribonuclease	Worthington, Lakewood USA
Donkey-Anti-Sheep-IgG 713-065-003	Dianova, Hamburg
Goat-Anti-Mouse-Endostatin-IgG BAF570	R&D Systems, Minneapolis, USA
Hyaluronidase	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin von hog stomach	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe

2.1.7 Puffer und Lösungen

ABC-Komplex für Immunhistochemie

2,5 ml 0,1 M Trispuffer, ABC-Kit (je 1 Tropfen Reagenz A und B 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen)

Blockingpuffer für Immunhistochemie

90 ml Aqua dest., 120 ml Trispuffer 0,2 M, 2400 mg NaCl, 60 ml Triton 4%, 30 ml Eselserum für Endostatin

DAB-Stammlösung (10 x konzentrierte Stammlösung) für Immunhistochemie

10 ml Aqua dest., 10 mg BSA (bovines Serumalbumin), 50 mg DAB (Diaminobenzidin)

DAB Arbeitslösung (gebrauchsfertig) für Immunhistochemie

600 µl DAB/BSA-Stammlösung, 5400 µl 0,1 M m-PBS-Puffer, 240 µl Ni/Co Lösung, 18 µl H₂O₂ 6% (direkt vor Verwendung zugeben)

Gelatine-Lösung für Objektträgerbeschichtung

50 ml Aqua dest., 0,5 g Gelatine (Porcine Skin), solve in heat, 0,05 g Chromalaun, 125 µl Glutardialdehyd

McIlvain-Puffer (für Pepsin-Andaulösung) für Immunhistochemie

Ca. 67,8 ml von Lösung 1 (0,1 M C₆H₈O₇ x H₂O (21 g auf 1 l Aqua dest.)) mit ca. 32,2 ml von Lösung 2 (0,2 M Na₂HPO₄ x 2H₂O (35,6 g auf 1 l Aqua dest.)) auf pH 3,6 einstellen

Ni/Co-Lösung (für DAB Arbeitslösung) für Immunhistochemie

10 ml Aqua dest., 100 mg NiCl₂, 5 mg CoCl₂, 10 mg BSA

PBS-Puffer (0,2 M) für Standardfixans

35,6 g Na₂HPO₄x2H₂O auf 100 ml Aqua dest., 13,8 g NaH₂PO₄xH₂O auf 500 ml Aqua dest., Mischung ca. 5 Teile + 1 Teil bis pH 7,4

m-PBS-Puffer (10 x konzentrierte Stammlösung 1 M) für Immunhistochemie

300 ml Aqua dest., 47,2 g $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 6,6 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 36,0 g NaCl
mit Aqua dest. auf 500 g auffüllen, pH zwischen 7,0 und 7,4

Pepsin-Andaulösung 0,1% für Immunhistochemie

3 mg Pepsin, 3 ml McIlvaine-Puffer

Peroxidaseblocklösung für Immunhistochemie

1 ml Methanol, 1ml H_2O_2 30%, 8 ml PBS-Puffer

Standardfixans

4 g Paraformaldehyd, 50 ml PBS 0,2 M, solve in heat, mit Aqua dest. auf 100 ml
auffüllen

Standardfixans mit Glutardialdehyd

50 ml Standardfixans, 2 ml Glutardialdehyd

Toluidinblaufärbelösung 0,1%

500 mg Toluidin Blau O, 500 ml Aqua dest.

Trispuffer 0,2 M (für Wasch- und Blockingpuffer) für Immunhistochemie

1000 ml Aqua dest., 24,228 g Tris, mit HCl auf pH 7 einstellen

Tyrodes-Lösung für Ascorbinsäure

9,73 g Tyrodes Salz, 0,2 g $NaHCO_3$, 10 ml Penicillin-Streptomycin, 990 ml H_2O

Waschpuffer für Immunhistochemie

2220 ml Aqua dest., 780 ml Trispuffer 0,2 M, 24,96 g NaCl

2.1.8 Medien, Medienzusätze und Seren

Eselserum	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Rinderserum (FBS)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe

Mesenchymale Stammzellkulturen

Low Glucose DMEM (1000 mg/l), 10% FBS, 1% Hepes Puffer, 1% Penicillin-
Streptomycin

Chondrogenes Medium (Aggregatkulturmedium)

High Glucose DMEM (4500 mg/l), 10% Pyruvat, 10% ITS, 10% Dexamethason, 10% TGFβ1, 10% Ascorbinsäure

Meniskuszellmedium

RPMI 1640 Medium, 10% FCS, 1% Pencillin-Streptomycin, 1% Hepes

2.1.9 Adhäsions – und Wachstumsfaktoren

Ascorbinsäure (L-Ascorbic Acid-2-Phosphat)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
ITS +3	Sigma Aldrich, Steinheim
Transforming Growth Factor-β1	R&D Sytstems, Wiesbaden

Ascorbinsäure

0,1024 g L-Ascorbinsäure in 20 ml Tyrodes. Lsg.

Dexamethason (Stock)

0,00392 g Dexamethason in 10 ml 100% Ethanol

Dexamethason (Gebrauch)

200 µl Stocklösung in 19,8 ml DMEM Low Glucose

2.1.10 Biomaterialien

Die Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine-Kompositmatrices (Abbildungen 2.1 und 2.2) wurden vor jedem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch nach einem patentierten Herstellungsverfahren (Europäisches Patent Nr.: PCT/EP99/09444) frisch hergestellt. Das Hyaluronan-Gelatine Verhältnis betrug stets 70% zu 30%. Dieses Mischungsverhältnis hat sich in zahlreichen Vorversuchen sowohl mechanisch als auch biologisch bewährt. Die Hyaluronankomponente wurde kommerziell als Produkt Jaloskin® (Fidia Advanced Biopolymers) erworben, hydrolysiertes bovines Kollagen der Firma Sigma stellte die Gelatine-Komponente dar. Beide Komponenten wurden gemeinsam gelöst und durch einen Lufttrocknungs- und Salzauswaschungsprozeß in spongiöse Scheiben umgewandelt. Die Porengröße der 1,3 mm hohen und im Durchmesser 2 mm großen Trägermatrices betrug 350-450 µm. In der Abbildung 2.2 wird anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in der linken und mittleren Spalte die hohe Porosität der Matrix und deren Sekundärporenbildung dargestellt. Die rechte Spalte zeigt die mit mesenchymalen

Progenitorzellen beladene Trägermatrix.



Abbildung 2.1: Hyaluronsäurebenzylester-Gelatine Kompositmatrix in Aufsicht.

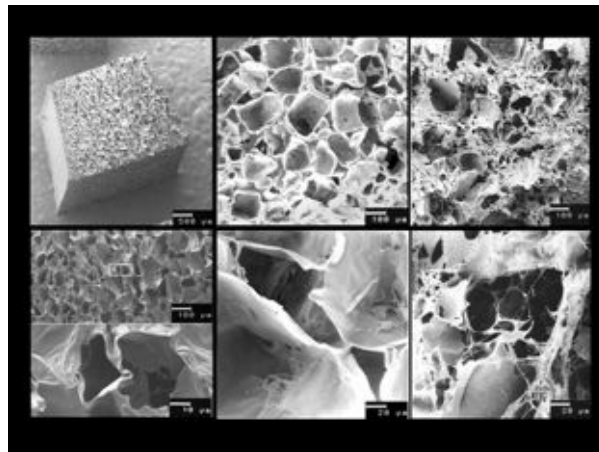


Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahmen der verwendeten Tissue Engineering Trägermatrix.

2.1.11 Zellmaterial

Sowohl mesenchymale Stammzellen als auch Meniskuszellen und ganze Menisken stammten von Kaninchen. Das verwendete Material wurde männlichen New-Zealand-White-Rabbits der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, entnommen. Die Verfahren zur Zellgewinnung werden im Methodenteil (siehe 2.2.1) erläutert.

2.1.12 Tiere

Balb/c nu/nu Mäuse ♂

Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld

New-Zealand-White-Rabbits ♂

Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln

Die Tiere wurden im Tierstall des Klinikums der Universität Regensburg gehalten.

2.1.13 Intravitalmikroskopie

Zur Untersuchung der Angiogenese in zellbeladenen Tissue Engineering Matrices wurde ein neues Verfahren entwickelt, dessen Ursprünge in der Tumorforschung liegen [123, 124, 127]. Hierfür werden immundefizienten Nacktmäusen eigens für diese Methode konstruierte, transparente Titanrückenhautkammern (Abbildung 2.3) angenäht. Innerhalb dieser Kammern kann man nach Ruhigstellung der Tiere in speziellen Halterungen (Abbildung 2.4) den Verlauf der Angiogenese in die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, einer Digitalmikroskopkamera und eines SVHS Videorekorders täglich über einen Zeitraum von maximal vierzehn Tagen dokumentieren.

Diese Versuche wurden von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Aktenzeichen: 621-2531.1-18/02).

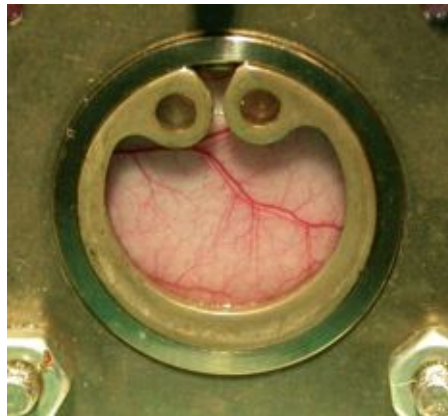


Abbildung 2.3: Transparente Titanrückenhautkammer ohne Meniskusring in 4-facher Vergrößerung



Abbildung 2.4: Fixierungsplatte aus Plexiglas in 6-facher Verkleinerung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden und Zellherkunft

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminar Flow) durchgeführt. Alle verwendeten Zellkulturen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Hera Cell 240) kultiviert. Zwei- bzw. dreimal wöchentlich wurde das jeweilige Zellkulturmedium erneuert.

2.2.1.1 Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen stammten aus Knochenmark, welches männlichen New-Zealand-White-Rabbits der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, entnommen wurde.

Zu diesem Zweck wurden die Kaninchen mit einer Mixtur von 0,6 ml/kg aus Ketamin 10% (2,5 ml) und Xylazin 2% (2,5 ml) mittels glutealer i.m. Injektion narkotisiert. Nach Positionierung der Kaninchen in Bauchlage und sterilem Abdecken der Beckenkämme erfolgte beidseits die Inzision der Haut auf ca. 1-2 cm Länge und nach Spalten der Faszie die Darstellung des Beckenkamms. Dieser wurde mit einer 16 Gauge Nadel punktiert und jeweils ca. 4 ml Knochenmark mit einer heparinisierten Spritze aspiriert. Nach dem Faszienverschluss wurde die Haut mit resorbierbarem Fadenmaterial vernäht.

Nach der oben beschriebenen Entnahme des Kaninchenknochenmarks erfolgte die sofortige Kultivierung. Zunächst wurde das in Spritzen aufbewahrte, heparinisierte Knochenmark in Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend in serumhaltigem Medium aufgenommen. Nach Abzentrifugieren (1700 min⁻¹; 20°C; 5 Minuten) wurde das Zellpellet in 10 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und die Lebendzellzahl (siehe 2.2.1.4) bestimmt.

Die gewonnenen Zellen wurden auf eine Zelldichte von 20x10⁶ Zellen pro 15 ml serumhaltigem Medium eingestellt, anschließend auf eine 75 cm² Kulturflasche ausgebracht und im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; wasserdampfgesättigt) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte nach einer einwöchigen Adhäsionsphase alle drei Tage.

Nach Erreichen einer etwa 80%igen Konfluenz (nach circa drei Wochen) wurden die adhärennten Zellen vom Kulturflaschenboden abgeerntet und weiterverarbeitet.

2.2.1.2 Zellkultur von Meniskuszellen

Die verwendeten Meniskuszellen stammten aus Menisken, die männlichen New-Zealand-White-Rabbits der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, entnommen wurden.

Zu diesem Zweck wurden die Kaninchen mit einer Mixtur von 0,6 ml/kg aus Ketamin 10% (2,5 ml) und Xylazin 2% (2,5 ml) mittels glutealer i.m. Injektion narkotisiert. Anschließend wurden die Versuchstiere mit einer intravenös applizierten Überdosierung von Pentobarbital (Narcoren) getötet. Als Applikationsort wurde eine Ohrvene der Versuchstiere gewählt. Nach Positionierung der Kaninchen in Rückenlage und sterilem Abdecken erfolgte beidseits die Inzision und die sterile Explantation der Außen- und Innenmenisken nach Querdurchtrennung der Patellarsehne, der Kollateral- und Kreuzbänder, sowie der Kapselstrukturen.

Intraoperativ wurden die entfernten Menisken bis zur weiteren Verarbeitung steril in serumfreies RPMI Medium gegeben. Die Weiterverarbeitung erfolgte unmittelbar nach Gewebeentnahme.

Mechanische Dissoziation:

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden die Menisken von Fett und Bindegewebe mit einem Skalpell getrennt und in kleine Stückchen mit maximaler Größe von 1 mm³ zerschnitten. Dabei wurden die Meniskusstückchen durch serumfreies RPMI Medium vor dem Austrocknen bewahrt. Nach mechanischer Zerkleinerung der Menisken wurden die Stückchen je zweier Menisken in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) gegeben.

Enzymatische Dissoziation:

8 ml serumfreies RPMI Medium und die Enzyme Kollagenase (Konzentration 1 mg/ml), Hyaluronidase (Konzentration 0,1 mg/ml) und Desoxyribonuclease (Konzentration 0,15 mg/ml) wurden pro Zentrifugenröhrchen (15 ml) zu den bereits darin befindlichen Stückchen je zweier Menisken zugegeben. Zur fünfzehnstündigen enzymatischen Dissoziation wurden die Zentrifugenröhrchen auf einem Taumler fixiert.

Die Zellsuspensionen wurden jeweils durch einen Filtrationsprozess (70 µm Filter) von den nicht dissoziierten, restlichen Meniskusstückchen und Debris getrennt.

Die Enzymreaktionen wurden durch die Zugabe von 40 ml serumhaltigem Meniskuszellmedium gestoppt. Nach Abzentrifugieren (2000 min⁻¹; 20°C; 5 Minuten) wurde das Zellpellet in 5 ml serumhaltigem Meniskuszellmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.2.1.4).

Die gewonnenen Zellen wurden auf eine Zelldichte von 10^6 Zellen pro 15 ml serumhaltigem Meniskuszellmedium eingestellt, anschließend auf eine 75 cm² Kulturflasche ausgebracht und im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; wasserdampfgesättigt) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte nach einer einwöchigen Adhäsionsphase alle drei Tage.

Anschließend wurden nach Erreichen einer etwa 80%igen Konfluenz (nach circa drei Wochen) die adhärenenten Zellen für eine größere Ausbeute vom Kulturflaschenboden abgelöst und in einem Verhältnis von 1:4 auf neue Kulturflaschen ausgebracht.

Hierzu wurde das Kultivierungsmedium verworfen, die Zellen einmalig mit 3 ml sterilem PBS Puffer gespült und 3 ml Trypsin auf den adhärenenten Zelllayer aufgebracht. Auf die vollständige Bedeckung der Zellschicht mit Trypsin wurde geachtet. Nach einer Einwirkzeit von circa fünf Minuten bei 37°C im Brutschrank, wurde in regelmäßigen Abständen das vollständige Ablösen der Zellen im Invertmikroskop kontrolliert und die Enzymreaktion bei vollständiger Adhärenzaufhebung durch die Zugabe von 7 ml serumhaltigem Meniskuszellmedium geblockt. Nach Bestimmen der Lebendzellzahl (siehe 2.2.1.4) wurden die Zellen zentrifugiert (2000 min⁻¹; 20°C; 5 Minuten), der Überstand verworfen. Nach Resuspension mit serumhaltigem Meniskuszellmedium wurde die gewonnene Zellsuspension auf vier neue Kulturflaschen aufgeteilt und auf ein Gesamtvolumen von 15 ml eingestellt.

Nach erneutem Erreichen einer etwa 80%igen Konfluenz (nach weiteren drei Wochen) wurden die adhärenenten Meniskuszellen vom Kulturflaschenboden abgeerntet und weiterverarbeitet.

2.2.1.3 Besetzen der Scaffolds mit mesenchymalen Zellen bzw. Meniskuszellen

Für die Weiterverarbeitung der beiden Zellreihen wurde das jeweilige Kultivierungsmedium verworfen, die Zellen einmalig mit 3 ml sterilem PBS Puffer gespült und 3 ml Trypsin auf den adhärenenten Zelllayer aufgebracht. Auf die vollständige Bedeckung der Zellschicht mit Trypsin wurde geachtet. Nach einer Einwirkzeit von circa fünf Minuten bei 37°C im Brutschrank, wurde in regelmäßigen Abständen das vollständige Ablösen der Zellen im Invertmikroskop kontrolliert und die Enzymreaktion bei vollständiger Adhärenzaufhebung durch die Zugabe von 7 ml serumhaltigem MSC Medium bzw. serumhaltigem Meniskuszellmedium geblockt. Nach Bestimmen der Lebendzellzahl (siehe 2.2.1.4) wurden die Zellen zentrifugiert (2000 min⁻¹; 20°C; 5 Minuten) und der Überstand verworfen.

Die reinen Zellkonzentrate wurden in Aggregatkulturmedium derart resuspendiert und

vorsichtig auf die in einer Well-Platte gelagerte Matrix pipettiert, so dass jede Matrix mit ungefähr 800.000 Zellen einer Zellreihe beschichtet wurde.

Das Einbringen der Zellen in die dreidimensionale Trägermatrix erfolgte durch vorsichtiges Beladen über die Matrixoberfläche. Um eine homogene Verteilung der Zellsuspension zu gewährleisten, musste ein etwaiger Lufteinschluss vermieden werden.

Die leer gebliebenen Wells wurden mit PBS Puffer befüllt, um ein Austrocknen der Matrix zu verhindern. Nach einer zweistündigen Adhäsionsphase im Brutschrank wurde Aggregatkulturmedium hinzugegeben.

Je nach Versuchsgruppe wurde die Matrix einen oder vierzehn Tage in Aggregatkulturmedium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Beim Vitalitätsassay wurden 50 µl der konzentrierten Zellsuspension entnommen und mit 50 µl Trypanblau (0,05%) resuspendiert. Trypanblau färbt tote Zellen blau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. Hierdurch ist eine prozentuale Bestimmung von lebenden Zellen möglich.

Nach kurzer Einwirkzeit erfolgte die Vitalitätsprüfung und Zellzählung in der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop. Die erzielte Zellzahl errechnet sich aus der Formel $N = Z \times X \times 10^4$, wobei Z die gezählte Zellzahl, X den Verdünnungsfaktor, der sich aus dem Suspensionsvolumen und der 2-fachen Verdünnung mit Trypanblau errechnet, und der Faktor 10^4 den „Kammerfaktor“ darstellen.

2.2.2 Herstellung von Meniskuspellets und Meniskusringen

Die verwendeten Meniskusringe bzw. -pellets stammten aus Menisken, die männlichen New-Zealand-White-Rabbits der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, entnommen wurden.

Intraoperativ wurden die entfernten Menisken bis zur weiteren Verarbeitung steril in serumfreies DMEM high glucose Medium gegeben und im Brutschrank gelagert. Die Weiterverarbeitung erfolgte unmittelbar vor der Implantation des Konstrukts in die Maus.

2.2.2.1 Meniskuspellets

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden die Menisken von Fett und Bindegewebe mit einem Skalpell getrennt. Anschließend wurden die Menisken in einen Precision Brain Slicer der Firma ASI Instruments, Houston, USA, eingespannt und mittels Rasierklingen in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Meniskusscheiben wiesen so eine Dicke von 1 mm auf, welche physiologisch zur avaskulären Seite leicht abfallend war.

Aus den erhaltenen Scheiben wurden mit einer Biopsiestanze im Durchmesser 2 mm große Pellets entnommen. Bei dem Versuchsaufbau wurde streng zwischen vaskulären und avaskulären Anteilen unterschieden, weshalb die vaskulären und avaskulären Pellets mit maximal möglichem Abstand zueinander entnommen wurden.

Der Versuchsaufbau sah hier ein vaskuläres und ein avaskuläres Pellet pro Rückenhautkammer vor.

2.2.2.2 Meniskusringe

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden die Menisken von Fett und Bindegewebe mit einem Skalpell getrennt. Anschließend wurden die Menisken in einen Precision Brain Slicer der Firma ASI Instruments, Houston, USA, eingespannt und mittels Rasierklingen in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Meniskusscheiben wiesen so eine Dicke von 1 mm auf, welche physiologisch zur avaskulären Seite leicht abfallend war.

In die erhaltenen Scheiben wurde mit einer Biopsiestanze ein im Durchmesser 2 mm großes Loch in unmittelbarer Nähe zum avaskulären Rand gestanzt und anschließend die anteriore, posteriore und vaskuläre Seite mit einem Skalpell derart zugeschnitten, dass ein Meniskusring entstand.

Je nach Versuchsaufbau wurde der Defekt im Meniskusring leer belassen oder mit

unterschiedlich differenzierten Zell-Matrix-Konstrukten befüllt. Dazu wurde in den im Durchmesser 2 mm messenden Defekt das zuvor kultivierte, im trockenen Zustand ebenfalls im Durchmesser 2 mm große und 1,3 mm hohe Zell-Matrix-Konstrukt press fit eingepasst.

2.2.3 Angiogeneseuntersuchungen

2.2.3.1 Modell Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie stellt eine ursprünglich für die Tumorforschung entwickelte Untersuchungsmethode der Angiogenese in vivo dar. Unter Anwendung des Rückenhautkammermodells [123, 124, 127] konnte in einem in vivo Setting das Angiogeneseverhalten von Gefäßen in Meniskuspellets (vaskulär; avaskulär) sowie in unterschiedlich differenzierte Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte mikroskopisch untersucht werden.

Diese Versuche wurden von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Aktenzeichen: 621-2531.1-18/02).

2.2.3.2 Tiere

Es wurden männliche BALB/c nu/nu Mäuse der Firma Charles River Wiga (Deutschland) GmbH, Sulzfeld verwendet. Alle Tiere waren entsprechend der Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum. Um Narkoseproblemen vorzubeugen mussten die Mäuse vor der Operation wach sein und ein Mindestgewicht von 22g haben. Als Spender für die Erythrozyten dienten ebenfalls männliche BALB/c nu/nu Mäuse.

2.2.3.3 Operationstechnik

Wache BALB/c nu/nu Mäuse wurden mittels intraperitonealer Xylazin-Ketamin-Atropin-Injektion narkotisiert. Nach Positionierung der Mäuse in Bauchlage und Sprühdesinfektion der Rückenhaut erfolgte mittels zweier Haltenähte die Darstellung der Rückenhautfalte samt Gefäße im Durchlicht. Anschließend wurde der rückwärtige Teil des Titanrahmens angenäht bzw. per Stichinzision und vorübergehender Klemmung fixiert. Nach einem Positionswechsel der Mäuse in Rechtsseitenlage wurde kreisförmig die Haut der vorderen Rückenhautfalte und

darunterliegendes Bindegewebe entfernt. Danach wurde die Vorderseite des Titanrahmens (siehe Material Abb. 2.3) angenäht bzw. mit der Rückseite verschraubt. Das System wurde mit Hilfe eines in den Rahmen integrierten Glasdeckels abgeschlossen.

2.2.3.4 Versuchsaufbau

Für die Mikroskopie der Rückenhautkammer wurden die Tiere in Plexiglasröhren (siehe Material Abb. 2.4) schmerzfrei immobilisiert. Bereits in der Vorphase der Versuche wurden die Tiere durch Animierung mit Futterreizen auf ein Verweilen in den Plastikröhren konditioniert. Die Mäuse wurden täglich mit Hilfe eines Axiotech Vario Mikroskops und eines Videodokumentationssystems (Digitalkamera + S-VHS Video Rekorder) zur späteren Offline-Analyse des Gefäßwachstums und der Gefäßdichteentwicklung über 14 Tage intravitalmikroskopisch untersucht. Alle Untersuchungen waren nach den bisherigen Erfahrungen schmerzfrei für die Tiere und konnten daher im Wachzustand durchgeführt werden. Nach Beendigung der Beobachtungszeit (nach 14 Tagen) wurden die Versuchstiere durch Ethernarkose mit anschließender, zervikaler Dislokation getötet.

Es wurde der Einfluss von Meniskuspellets (vaskulär und avaskulär) sowie verschieden differenzierter Zell-Matrix-Konstrukte auf das angiotaktische Verhalten untersucht. Vor Beginn der 14-tägigen Beobachtungsphase musste das jeweilige Probenmaterial vorbereitet werden.

Die Versuchsdurchführung wird im Folgenden näher erläutert:

Allen BALB/c nu/nu Mäusen wurden Titan-Rückenhautkammern (RHK) implantiert (Operationstag: d -1).

Jedes in die Rückenhautkammer eingebrachte Implantat kam auf der durchbluteten Innenseite der rückwärtigen Maushaut zu liegen (siehe Abb. 2.5). In Aufsicht ergab sich die in Abb. 2.6 gezeigte Situation.

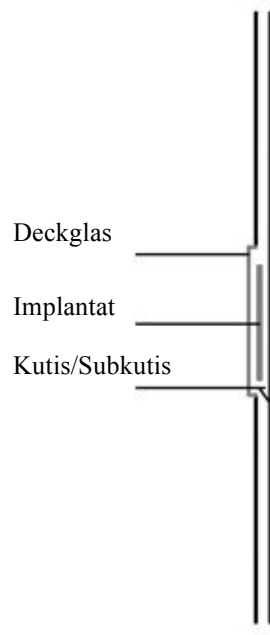


Abbildung 2.5: Schemazeichnung einer Rückenhautkammer mit Indikatoren.

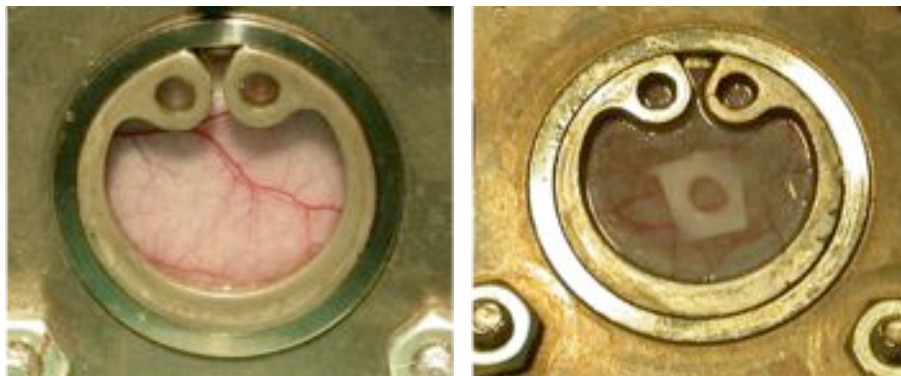


Abbildung 2.6: Transparente Titanrückenhautkammer vor und nach Implantation in 4-facher Vergrößerung.

2.2.3.4.1 Meniskuspellets

In der einen Versuchsgruppe wurden am Folgetag (Implantationstag: d 0), also nach Anbringung der RHK, in jede Kammer ein vaskuläres sowie ein avaskuläres Pellet ($n = 7$) eingesetzt.

2.2.3.4.2 Meniskusringversuche

In den Meniskusringversuchen wurde weiter zwischen Leerdefekt und Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukten unterschieden.

2.2.3.4.2.1 Leerdefekt

In der Leerdefektgruppe wurde am Folgetag (Implantationstag: d 0), also nach Anbringung der RHK, je ein Meniskusring mit leer belassenem Stanzdefekt (n = 5) implantiert.

2.2.3.4.2.2 Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte

Allen weiteren Gruppen wurde am Folgetag (Implantationstag: d 0), also nach Anbringung der RHK, je ein Meniskusring eingesetzt, der mit einem Zell-Matrix-Konstrukt versehen war. Dazu wurden die bioabbaubaren Matrices (Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositscaffold) mit je 800.000 Zellen (mesenchymale Zellen bzw. Meniskuszellen) beimpft (siehe 2.2.1.3) und nach einer zweistündigen Adhäsionsphase im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung je nach Untergruppe in die vorbereiteten Meniskusringe (siehe 2.2.2.2) eingesetzt und anschließend in die Kammern implantiert oder zuvor noch 14 Tage in oben genanntem Medium kultiviert und erst danach in die vorbereiteten Meniskusringe eingesetzt und anschließend in die Kammern implantiert.

Die vier verschiedenen, hier untersuchten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte sind:

MSC 1: 1 d vorkultiviertes Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen (n = 5)

MSC 14: 14 d vorkultiviertes Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen (n = 6)

FCZ 1: 1 d vorkultiviertes Konstrukt mit Meniskuszellen (Fibrochondrozyten) (n = 7)

FCZ 14: 14 d vorkultiviertes Konstrukt mit Meniskuszellen (n = 6)

Zur Vereinfachung werden im Folgenden nur die Abkürzungen MSC 1, MSC 14, FCZ 1 und FCZ 14 verwendet.

In allen Gruppen wurde die gerichtete Gefäßeinsprossung in diese Konstrukte über einen Zeitraum von 14 Tagen in vivomikroskopisch dokumentiert. Abschließend wurden die Implantate bezüglich Angiogenese histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet (Toluidinblau-Färbung, Endostatin- und Peroxidasenachweis) und das Videomaterial zur Gefäßdichte- und Gefäßfunktionabilitätsbestimmung ausgewertet.

2.2.3.5 Gefäßdichtebestimmung

Zur Dichtebestimmung der neugebildeten Gefäße wurde das täglich mit dem Videodokumentationssystem aufgenommene Bildmaterial an den Tagen d 7, d 10 und d 14 ausgewertet, Einzelbilder digital erzeugt und die maximale Gefäßlänge sowie die

Gefäßdichte mit Hilfe der frei erhältlichen Bilddokumentationssoftware ImageJ 1.34s (ImageJ 1.34s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) vermessen. Bei den Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukten wurde der Bereich der implantierten Matrices zur Auswertung herangezogen. Des Weiteren erfolgte hierbei eine Unterteilung der Matrices in vaskuläre und avaskuläre Hälfte.

Die mittlere vaskuläre Dichte wurde in Gefäßlänge (mm) pro Fläche (mm^2), gekürzt also mm^{-1} angegeben.

2.2.3.6 Gefäßfunktionabilitätsbestimmung

Die Funktionabilität der in die Matrices eingewachsenen, neugebildeten Gefäße wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Mäuseerythrozyten nachgewiesen.

2.2.3.6.1 Fluoreszenzfärbung von Mäuseerythrozyten

Venöses Blut wurde aus der Vena cava inferior einer Balb/c nu/nu Maus invasiv unter Narkose entnommen. Die Vena cava inferior wurde nach Eröffnen des Abdomens mit einer heparinisierten 27 G-Kanüle punktiert. Die Tiere wurden nachfolgend durch zervikale Dislokation getötet. Das erhaltene Blut wurde in PBS Puffer aufgenommen, die Erythrozyten durch Zentrifugation (1800 min^{-1} ; 5 Minuten) isoliert und im Anschluss zweimal mit PBS Puffer gewaschen (Zentrifugation 1800 min^{-1} ; 5 Minuten). Unter Verwendung des PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit (Sigma) wurden die Zellmembranen der Erythrozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH67 markiert. Die langen lipophilen Schwänze des Farbstoffs binden hierbei an den Lipidregionen der Erythrozytenzellmembranen. Je 100 Millionen gelabelte Erythrozyten wurden nach dreimaligen Waschen mit PBS Puffer (Zentrifugation 1800 min^{-1} ; 5 Minuten) über die Schwanzvene in die zu untersuchenden Tiere injiziert.

2.2.3.6.2 Detektion und Dokumentation

Der Nachweis der Funktionabilität der in die Matrices gewachsenen, neugebildeten Gefäße konnte über die Detektion des mit fluoreszenzmarkierten Erythrozyten angereicherten Blutes erbracht werden. Hierfür wurden die Nacktmäuse wie in Punkt 2.2.3.1 beschrieben intravitalmikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop Zeiss HBO100) untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe (EBQ 100 dc-z, Leistungselektronik Jena GmbH) angeregt. Der Blutfluss innerhalb der Gefäße wurde mit einer Videokamera (Sony 3CCD Color Video Camera) und eines SVHS Videorekorders

(Panasonic) dokumentiert.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Gewebeprevorbereitung

Mit Ausnahme des Untersuchungsmaterials für das Live/Dead Kit, das unmittelbar nach Versuchsende (Tag 14) weiterverarbeitet werden musste (siehe 2.2.4.4), wurden alle weiteren Proben bestehend aus Implantat und Mäusegewebe nach Versuchsende (Tag 14) entnommen und in Standardfixans zwei Stunden fixiert und anschließend über eine Saccharosereihe entwässert. Das Verfahren wurde wie folgt durchgeführt:

- 0,5 h fixieren mit Standardfixans plus Glutaraldehyd
- 1,5 h fixieren mit Standardfixans ohne Glutaraldehyd
- 1,5 h spülen mit 10%iger Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer)
- 1,5 h spülen mit 20%iger Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer)
- über Nacht spülen mit 30%iger Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer)

Danach wurde das Gewebe in Tissue Tek (Sakura) überführt und die Blöcke bei -80°C eingefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (Microm) wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm angefertigt und auf vorbeschichtete Adhäsivobjektträger aufgebracht. Nach vorsichtigem Waschen der Präparate in Aqua dest. zum Entfernen der Tissue Tek Reste, wurden die Schnitte für die jeweilige Färbung weiterbearbeitet.

Im Anschluss an die folgenden gewebespezifischen Färbungen wurden die Präparate über eine Isopropanolreihe entwässert und mit DePex Lösung luftdicht eingedeckt, über Nacht getrocknet und zur späteren Digitalphotoauswertung trocken aufbewahrt.

2.2.4.2 Toluidinblaufärbung

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

- 1) Die Präparate 5 min mit Aqua dest. spülen um Tissue Tek Reste abzulösen.
- 2) Die Schnitte in Toluidin-Blau-Lösung 0,1% überführen und 15 sek einwirken lassen.

3) Die Farbe abtropfen lassen und die Präparate zum Abwaschen überschüssiger Farbe kurz in Aqua dest. tauchen.

4) Mikroskopische Kontrolle der Färbeergebnisse und eventuell erneute Färbung.

5) Nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität Entwässerung der Präparate über eine Isopropanolreihe:

- 1 min mit 90%igem Alkohol spülen
- 5 min mit 100%igem Alkohol spülen
- 2 x 5 min mit Xylol spülen

2.2.4.3 Peroxidasenachweis

Für diesen Nachweis macht man sich die Eigenschaft von Peroxidasen, Diaminobenzidin (DAB) in ein wasserunlösliches, schwarzes Produkt umzusetzen, zunutze. In diesem Fall sollten endogene Peroxidasen, welche in Erythrozyten in hoher Konzentration vorkommen, diese Reaktion katalysieren. Eine Schwarzfärbung zeigt demnach ein Vorhandensein von erythrozytären Peroxidasen an. Ein indirekter Gefäßnachweis ist erbracht.

Die Präparatevorbereitung erfolgte wie unter Punkt 2.2.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die zu färbenden Schnitte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Auf jeden Schnitt wurden dann ca. 160-200 µl DAB-Arbeitslösung geben und die Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei ausreichender Färbung wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült, über eine Alkoholreihe entwässert und mit DePex eingedeckt.

2.2.4.4 Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit

Anders als bei allen anderen histologischen Methoden wurden die Implantate am Versuchsende (Tag 14) unmittelbar nach Entnahme ohne vorherige Fixierung weiterverarbeitet. Die Menisken wurden in serumhaltigen RPMI Medium, dem 4 µM Calcein AM und 2 µM Ethidiumbromid zugesetzt waren, für 22 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe einmalig mit sterilem PBS Puffer gespült, in Tissue Tek (Sakura) überführt und bei -80°C eingefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (Microm) wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 40 µm angefertigt und auf vorbeschichtete Adhäsivobjektträger aufgebracht. Nach vorsichtigem Waschen der Präparate in Aqua dest. zum Entfernen der Tissue Tek Reste, wurden die

Schnitte in DAPI eingedeckt.

Als Totkontrolle diente ebenfalls am Versuchsende (Tag 14) entnommenes Meniskusgewebe, das allerdings vor der Inkubation mit dem Kit einem zweimaligen Einfrier- und Auftauvorgang in flüssigem Stickstoff ausgesetzt wurde.

Calcein-AM kann durch die Zellmembran hindurch in lebende Zellen transportiert werden. Nach dem Transport in die Zelle wird die Acetoxymethylgruppe unspezifisch durch Esterasen abgespalten, und in Calcein umgewandelt. Dieses ist dann in der Lage, Calciumionen innerhalb der Zelle zu binden (zu komplexieren), was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert.

Ethidiumbromid gelangt nur bei toten Zellen mit defekter Zellmembran ins Zellinnere. Es wird nicht von lebenden Zellen aufgenommen. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren intrazellulär zwischen die Basen der Nukleinsäuren, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und in einer starken, roten Fluoreszenz resultiert.

2.2.5 Immunhistochemisches Verfahren

Die Präparatevorbereitung erfolgte wie unter Punkt 2.2.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die zu färbenden Schnitte luftblasenfrei in Färbekammern (Coverplate) eingespannt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden jeweils 200 µl Pepsinandauflösung zugegeben und nach Ablauf von 15 min erneut dreimal mit Waschpuffer gespült. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde durch eine 30-minütige Inkubierung mit je 200 µl Blockingpuffer erreicht. Anschließend erfolgte die Inkubation mit je 130 µl Primärantikörperlösung über Nacht auf einer Wippe. Die Negativ-Kontrollen blieben dabei mit Blockingpuffer beschichtet.

Am Folgetag wurde wieder dreimal mit Waschpuffer gespült. Anschließend wurde für 60 min der Sekundärantikörper (je 130 µl Antikörperlösung) aufgetragen – auch auf die Negativ-Kontrollen. Nach erneutem, dreimaligem Spülen wurden unspezifische Peroxidasen mittels MetOH-Peroxidaseblock geblockt. Währenddessen wurde die ABC-Lösung hergestellt, die 30 min vor ihrer Verwendung aktiviert werden musste. Nach dreimaligem Waschen wurde die ABC-Lösung für 90 min aufgetragen und die Schnitte danach in eine mit Waschpuffer gefüllte Küvette überführt. Anschließend wurden auf jeden Schnitt ca. 160-200 µl DAB-Arbeitslösung gegeben und die Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei ausreichender

Färbung wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült, über eine Alkoholreihe entwässert und mit DePex eingedeckt.

2.2.5.1 Endostatinnachweis

Endostatin, ein 20 kDa schweres Spaltprodukt von Kollagen XVIII, wirkt als endogener Angiogeneseinhibitor [122, 128].

Als Primärantikörper wurde Goat-Anti-Mouse-Endostatin-IgG (50 µg/ml) von R&D Systems und als Sekundärantikörper Donkey-Anti-Sheep IgG 1:500 (1,2 mg/ml) von Dianova verwendet.

2.2.6 Statistik

Es wurde eine deskriptive Statistik erstellt, bei der Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet wurden. Dabei wurde zwischen den einzelnen Gruppen (MSC 1, MSC 14, FCZ 1, FCZ 14) unterschieden, aber auch die verschiedenen Kulturzeiten (1 d vs. 14 d) wurden berücksichtigt. Mittelwerte und Standardabweichungen bezogen sich auf die gemessenen Einzelwerte der Gefäßdichte. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit SigmaStat 3.5 (SigmaStat, Systat Software GmbH, Erkrath), die graphische Darstellung mit Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2008 für Mac, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

3 Ergebnisse

3.1 Mittlere vaskuläre Dichte

Zur Dichtebestimmung der neugebildeten Gefäße wurde das mit dem Videodokumentationssystem täglich aufgenommene Bildmaterial an den Tagen d 7, d 10 und bei Versuchsende d 14 ausgewertet, die Länge der neu entstandenen Gefäße vermessen und auf die jeweilige Implantatfläche bezogen. Die so erhaltene Gefäßdichte wurde als Gefäßlänge (mm) pro Fläche (mm^2), gekürzt also mm^{-1} angegeben.

Sowohl bei den avaskulären als auch bei den vaskulären Meniskuspellets wurden die auf der Pelletsoberfläche neu entstandenen Gefäße jeweils mit der gesamten Fläche verrechnet (siehe Abb. 3.1).

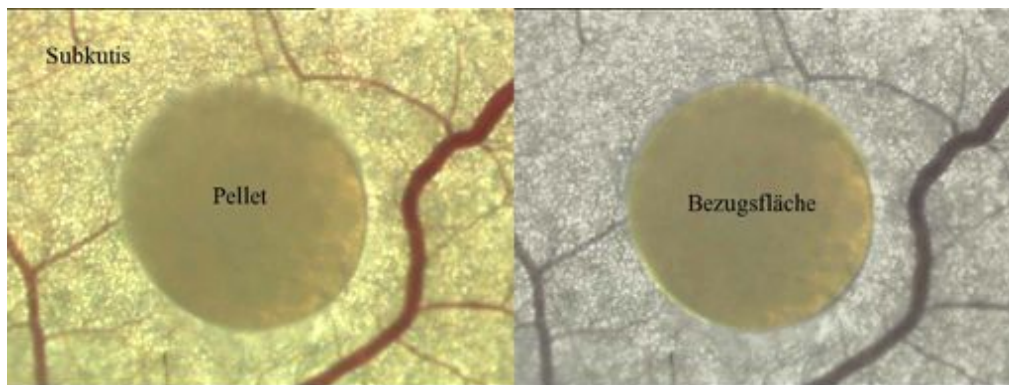


Abbildung 3.1: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines Pellets mit Gefäßsystem in der Rückenhautkammer.

Bei den Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukten wurde der Bereich der implantierten Matrices zur Auswertung herangezogen (siehe Abb. 3.2), bei den Leerdefekten der Stanzbereich (siehe Abb. 3.3). Des Weiteren erfolgte bei diesen beiden Gruppen eine Unterteilung der Matrices bzw. der leer belassenen Defekte in eine vaskuläre und avaskuläre Hälfte.

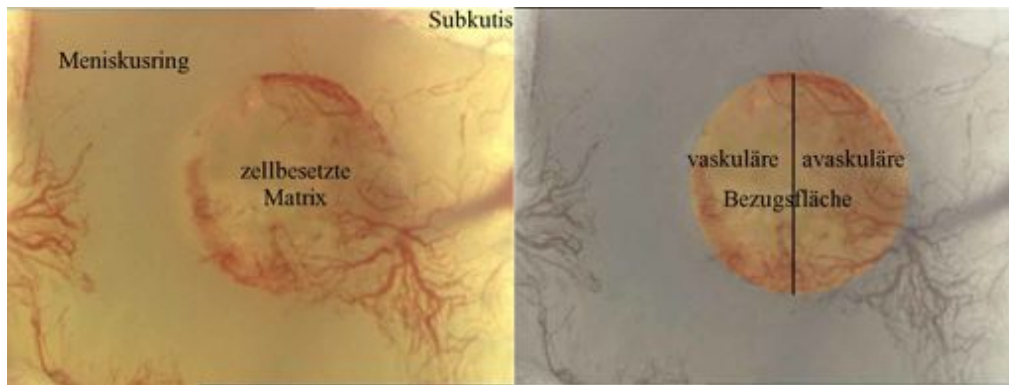


Abbildung 3.2: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines Meniskusring-Zellmatrix-Konstrukts mit Gefäßsystem in der Rückenhautkammer.

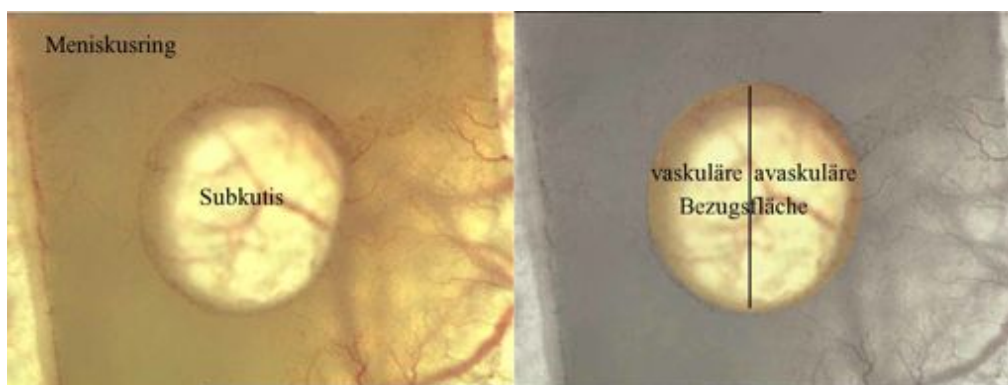


Abbildung 3.3: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines Leerdefekts mit Gefäßsystem in der Rückenhautkammer.

Den Bezugsflächen sowohl der Meniskuspellets als auch der Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukten war eine vaskuläre Dichte von 0 mm^{-1} am Implantationstag d 0 gemeinsam (siehe Abb. 3.4). Bei den für die Auswertung herangezogenen Stanzbereichen der Leerdefekte wurde die Ausgangssituation bei durchscheinenden Gefäßen in der Rückenhaut auf 0 mm^{-1} festgesetzt.

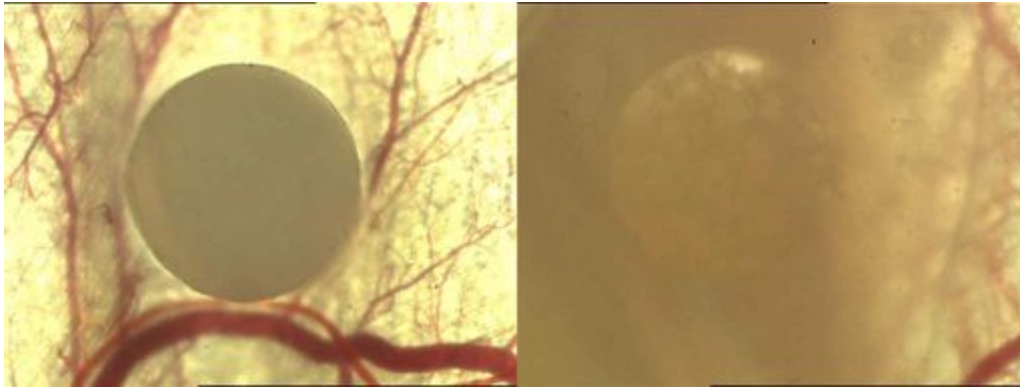


Abb. 3.4: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines Pellets (links) und eines Meniskusring-Zellmatrix-Konstrukts (rechts) ohne Gefäßsystem in der Rückenhautkammer am Implantationstag d 0.

Unabhängig von der Art des Implantats ließ der Beobachtungszeitraum Tag d 0 – d 7 keinen Unterschied bezüglich Angiogenese erkennen. Die Gefäßsituation der einzelnen Gruppen an den Versuchtagen d 7, d 10 und d 14 stellte sich dann jedoch wie folgt dar:

Pellets

Im Vorversuch dienten die Meniskuspellets ($n = 7$) einerseits der Machbarkeitsprüfung (Implantation von Meniskusgewebe in Rückenhautkammer), andererseits sollten sie bereits erste Rückschlüsse auf das Angiogeneseverhalten von nativem Meniskus im Hinblick auf die vaskuläre Differenzierung ermöglichen.

Sowohl die avaskulären als auch die vaskulären Pellets zeigten zunächst im Mittel ein leichtes Gefäßwachstum bis Tag 10 ($0,631 \text{ mm}^{-1}$ bzw. $1,450 \text{ mm}^{-1}$), um dann bis zum Versuchsende (d 14) noch einmal sichtbar zuzunehmen ($2,127 \text{ mm}^{-1}$ gegenüber $4,626 \text{ mm}^{-1}$).

Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen intravitalmikroskopische Aufnahmen der Meniskuspellets im zeitlichen Verlauf.

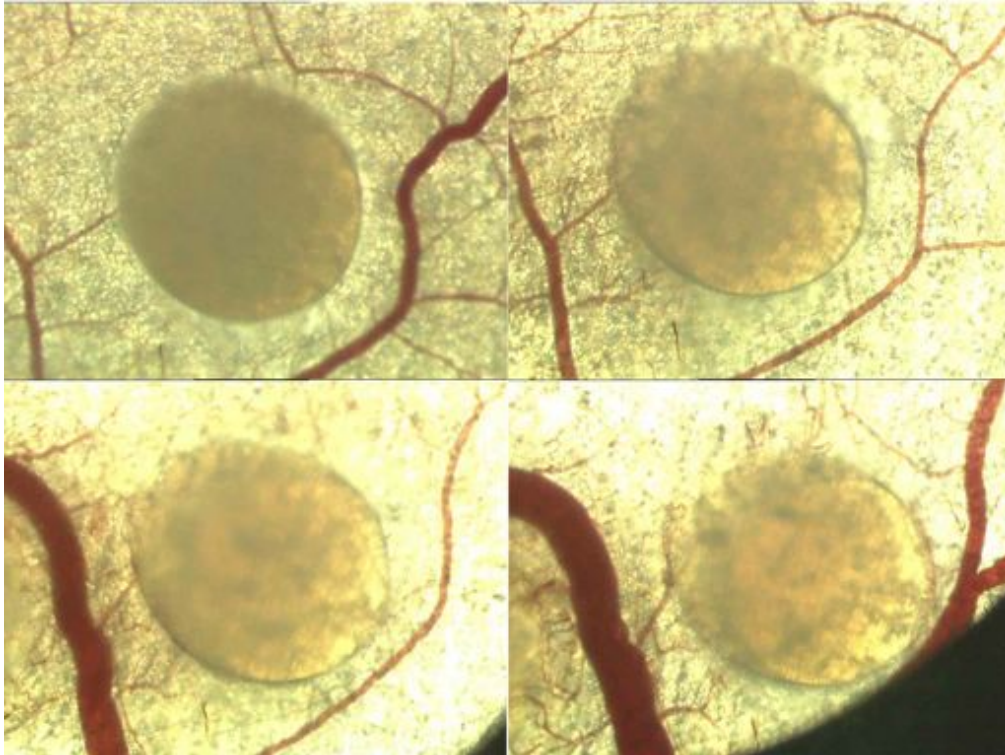


Abbildung 3.5: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines avaskulären Pellets mit Gefäßsystem in der Rückenmarkshöhle an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten).

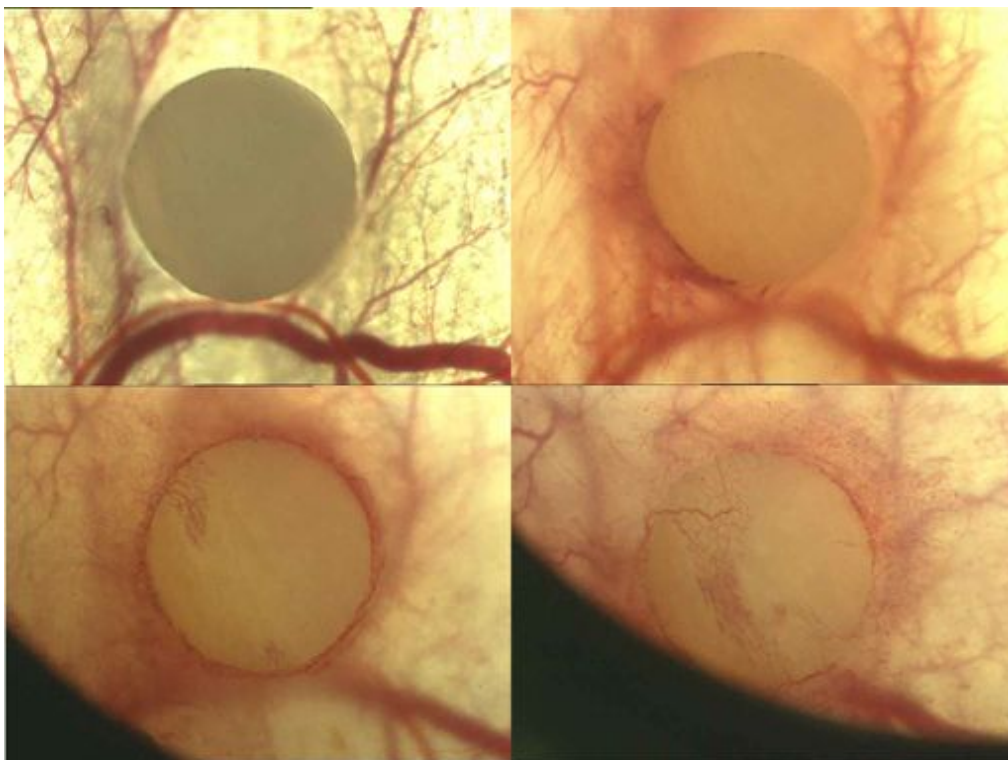


Abbildung 3.6: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines vaskulären Pellets mit Gefäßsystem in der Rückenmarkshöhle an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten).

Sowohl avaskuläre als auch vaskuläre Pellets induzieren Gefäßwachstum auf ihrer Oberfläche. Die aus vaskulärem Meniskus bestehenden Pellets ließen ein stärkeres, mittleres Gefäßwachstum erkennen. Vaskuläre Meniskus-Pellets zeigten also eine größere Tendenz zur Induktion von Angiogenese als avaskuläre Meniskus-Pellets, jedoch war dies statistisch nicht signifikant.

Tabelle 3.1 gibt einen grafischen Überblick über die Gefäßdichteverhältnisse bei den Pellets, Tabelle 3.2 zeigt eine tabellarische Übersicht über die Einzelwerte.

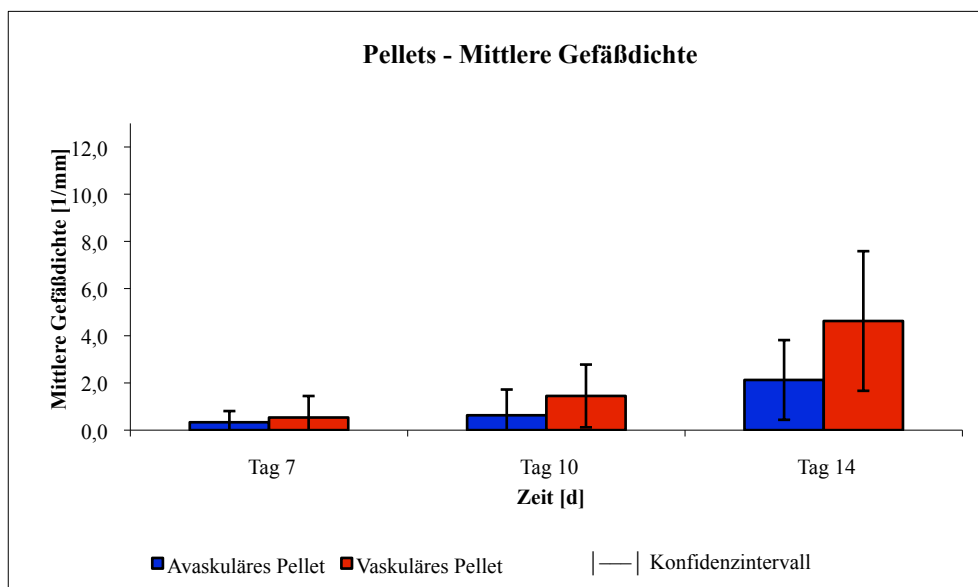


Tabelle 3.1: Grafische Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte von avaskulären und vaskulären Meniskuspellets unter Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm ⁻¹]							MW	STABW	p-value
Avaskulär n = 7	Tag 7	0,000	0,640	0,478	0,000	0,000	0,000	1,223	0,335	0,475	
	Tag 10	0,977	0,210	0,214	0,000	0,000	0,037	2,980	0,631	1,091	
	Tag 14	1,318	2,245	4,737	1,625	0,584	0,321	4,062	2,127	1,689	
Vaskulär n = 7	Tag 7	0,000	0,060	2,536	0,516	0,000	0,108	0,530	0,536	0,911	0,614
	Tag 10	2,330	0,411	2,575	3,328	0,000	0,084	1,420	1,450	1,330	0,232
	Tag 14	10,159	2,81	3,607	6,672	1,609	2,579	4,945	4,626	2,959	0,076

Tabelle 3.2: Tabellarische Übersicht über die mittlere Gefäßdichte von avaskulären und vaskulären Meniskuspellets unter Angabe der Mittelwerte (MW), der Standardabweichungen (STABW) und der Signifikanz (p-value).

Leerdefekte

Analog zum Meniskus-Pellets-Modell zeigten die Meniskusringe mit leer belassenem Stanzdefekt ($n = 5$) als Kontrolle der Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte sowohl auf ihrer vaskulären, als auch auf ihrer avaskulären Oberfläche Gefäßwachstum. Das für die Gefäßdichtemessung herangezogene Defektareal wies nur geringe durch den Leerdefekt induzierte Angiogenesetendenzen auf. Einzig im unmittelbaren Übergangsbereich zwischen Meniskus und Defekt war Angiogenese erkenn- und damit messbar. Bis zum Versuchsende (d 14) wurde insgesamt eine mittlere Gefäßdichte von $1,220 \text{ mm}^{-1}$ erreicht.

Die Abbildung 3.7 zeigt intravitalmikroskopische Aufnahmen eines Leerdefekts im zeitlichen Verlauf.

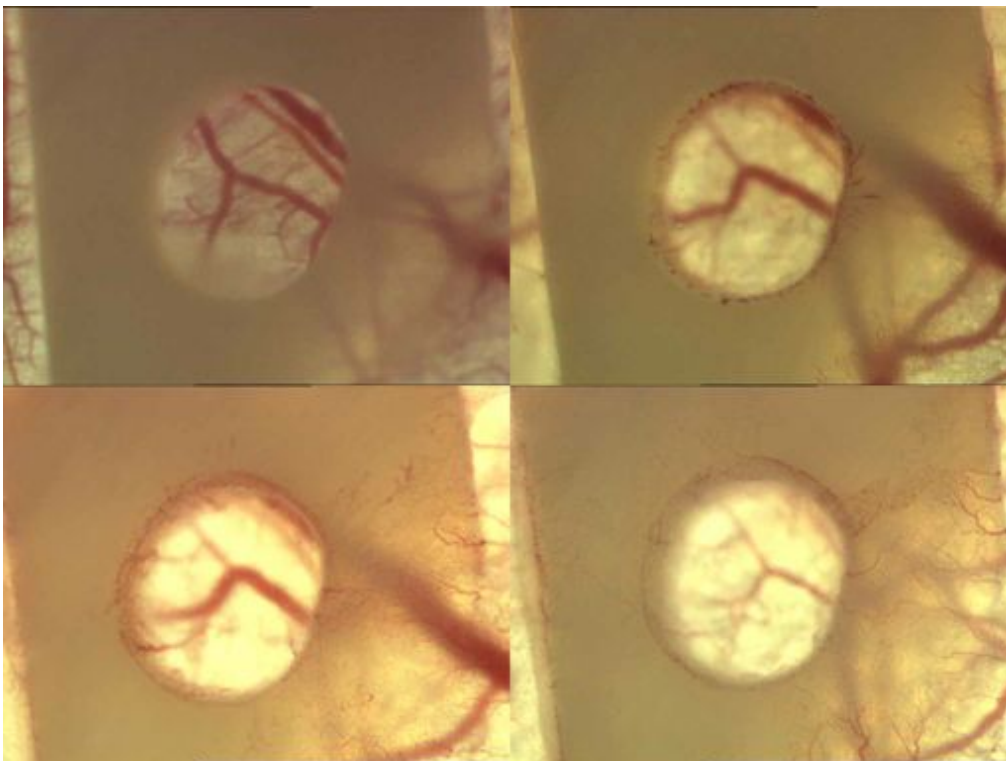


Abbildung 3.7: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines Leerdefekts in der Rückenmarkshöhle an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten). In allen Bildern werden die avaskulären Meniskusanteile der rechten von den vaskulären Meniskusanteilen der linken Bildhälfte von dem Stanzdefekt in der Bildmitte getrennt.

Tabelle 3.3 zeigt eine Zusammenstellung der Gefäßdichteverhältnisse bei den Leerdefekten.

Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm^{-1}]					MW	STABW
Leerdefekt n = 5	Tag 7	0,259	0,000	0,000	0,735	0,528	0,304	0,325
	Tag 10	0,636	0,451	1,280	1,365	1,003	0,947	0,397
	Tag 14	1,054	1,618	1,819	0,976	0,634	1,220	0,487

Tabelle 3.3: Tabellarische Übersicht über die mittlere Gefäßdichte der Leerdefekte unter Angabe der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen (STABW).

Zusätzlich wurden die Leerdefekte wie oben beschrieben noch in eine dem avaskulären Meniskus und in eine dem vaskulären Meniskus zugewandte Hälfte unterteilt. Die Auswertung des durch avaskuläre bzw. vaskuläre Meniskusanteile induzierten Gefäßwachstums wies hier keine Unterschiede auf.

Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte

Die MSC 1 (n = 5) zeigten nach einer Woche (d 7) noch kaum angiogenetische Aktivität ($0,226 \text{ mm}^{-1}$). Am Tag 10 war die Gefäßdichte auf $1,612 \text{ mm}^{-1}$ angestiegen. Bei Versuchsende am vierzehnten Tag betrug die Gefäßdichte der MSC1 dann $2,426 \text{ mm}^{-1}$.

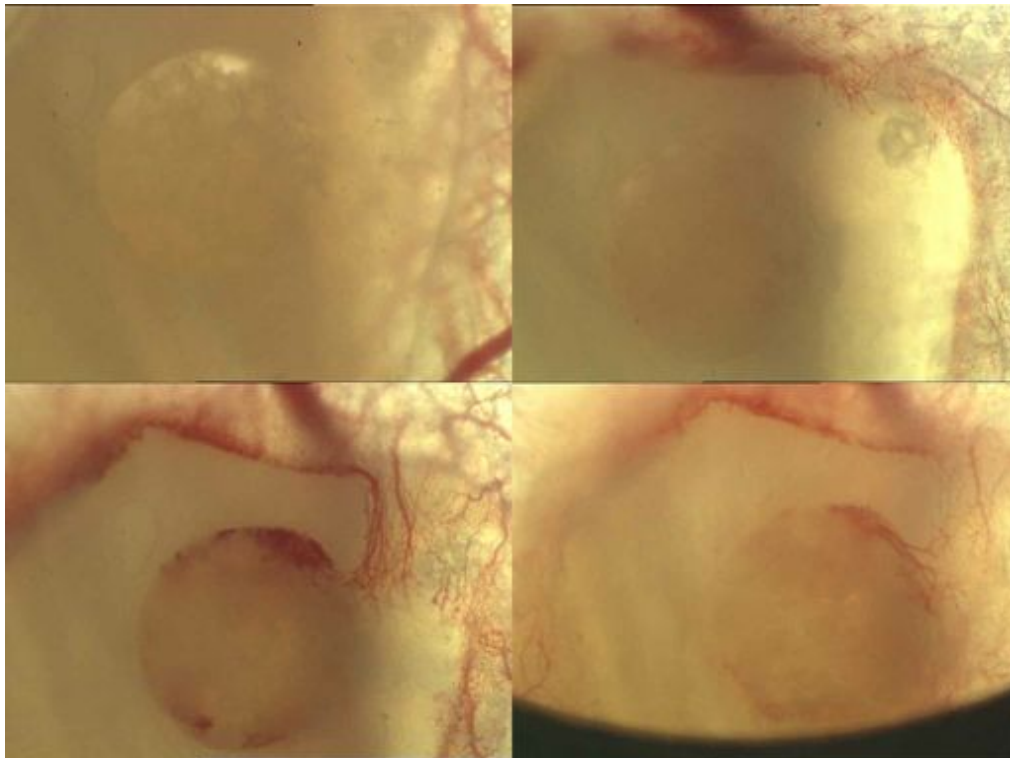


Abbildung 3.8: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Konstrukts (MSC 1) in der Rückenmarkshöhle an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten).

Die MSC 14 (n = 6) zeigten bereits am siebten Tag eine frühe angiogenetische Wirkung mit einer durchschnittlichen Gefäßdichte von $1,299 \text{ mm}^{-1}$. Weiter fand sich am zehnten Tag die größte Dichtezunahme aller Konstrukte auf $4,798 \text{ mm}^{-1}$, bevor sie am Versuchsende (d 14) $7,274 \text{ mm}^{-1}$ betrug.

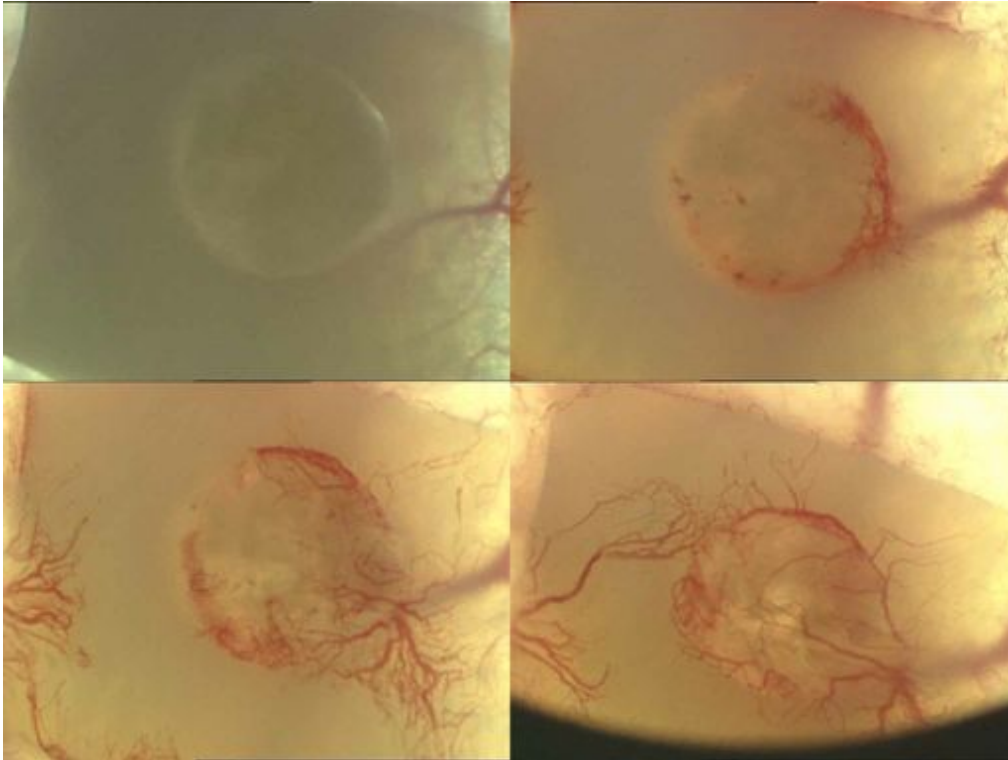


Abbildung 3.9: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Konstrukts (MSC 14) in der Rückenhautkammer an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten).

Die FCZ 1 ($n = 7$) zeigten am Tag 7 noch keine angiogenetische Wirkung ($0,043 \text{ mm}^{-1}$). Diese stieg zum Tag 10 gering an auf im Schnitt $0,288 \text{ mm}^{-1}$. Zu Versuchsende (d 14) ergab sich eine Gefäßdichte von $2,735 \text{ mm}^{-1}$. Damit lag diese leicht über der durch die MSC 1 induzierten Gefäßdichte am vierzehnten Tag.

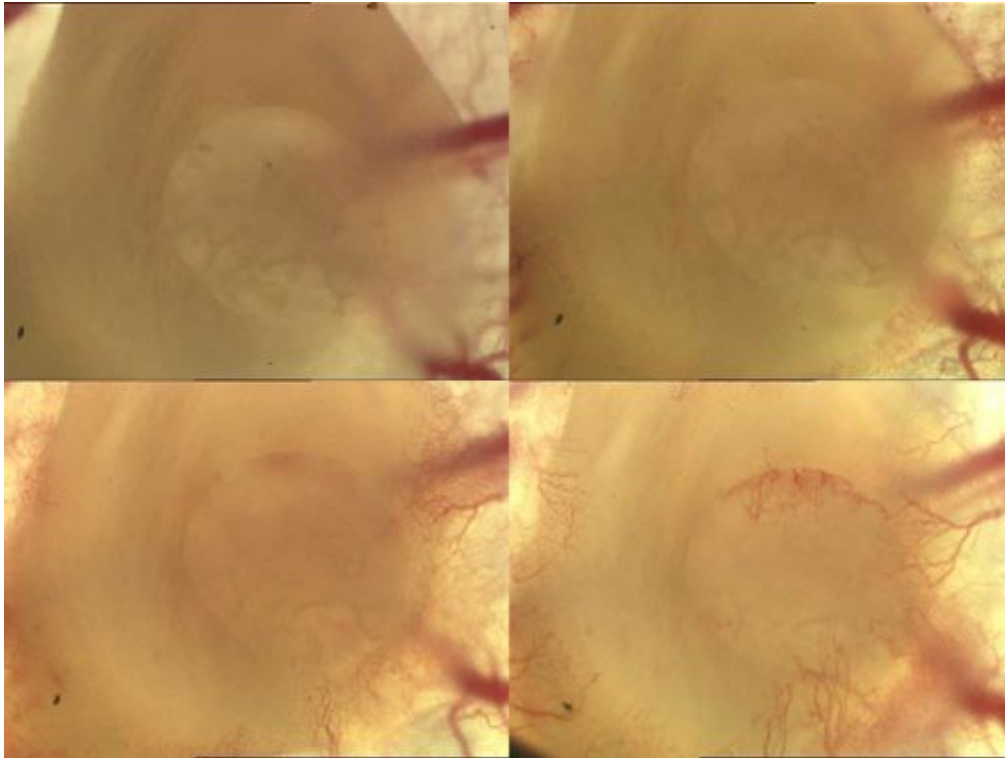


Abbildung 3.10: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Konstrukts (FCZ 1) in der Rückenhautkammer an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten).

Während die FCZ 14 am siebten Tag minime angiogenetische Wirkung zeigten ($0,210 \text{ mm}^{-1}$), stieg die Gefäßdichte am Tag 10 auf $2,328 \text{ mm}^{-1}$ an. Am Tag 14 erreichte die durch die FCZ 14 induzierte Gefäßdichte mit $7,232 \text{ mm}^{-1}$ nahezu die der MSC14.

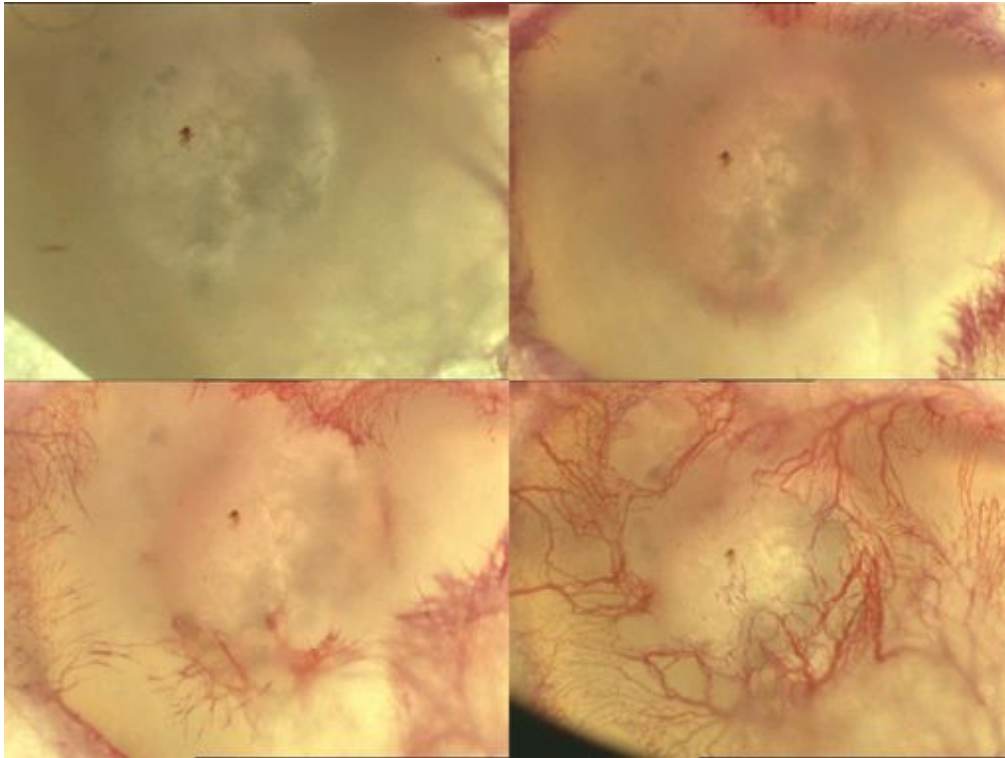


Abbildung 3.11: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Konstrukts (FCZ 14) in der Rückenhautkammer an den Versuchstagen 1, 7, 10 und 14 (von links oben nach rechts unten).

Die Tabellen 3.5 bis 3.7 geben einen Überblick über die Gefäßdichteverhältnisse der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte.

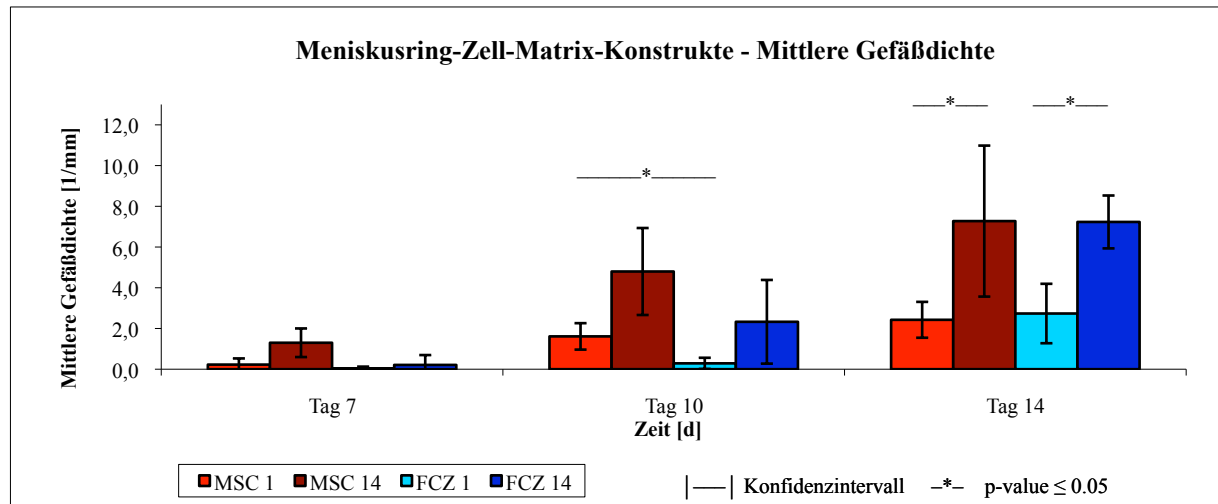


Tabelle 3.5: Grafische Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte unter Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm ⁻¹]							MW	STABW
MSC 1 n = 5	Tag 7	0,000	0,150	0,759	0,109	0,113			0,226	0,303
	Tag 10	0,737	1,593	2,539	1,766	1,423			1,612	0,649
	Tag 14	0,960	2,626	2,363	2,976	3,205			2,426	0,881
MSC 14 n = 6	Tag 7	0,704	2,442	0,589	1,160	1,108	1,793		1,299	0,702
	Tag 10	4,015	8,041	5,185	6,256	2,909	2,383		4,798	2,136
	Tag 14	7,430	10,890	12,559	4,083	4,730	3,949		7,274	3,708
FCZ 1 n = 7	Tag 7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,221	0,043	0,084
	Tag 10	0,000	0,000	0,310	0,243	0,453	0,219	0,788	0,288	0,274
	Tag 14	1,170	1,581	1,287	4,390	2,588	4,615	3,513	2,735	1,459
FCZ 14 n = 6	Tag 7	0,000	0,019	0,044	0,000	0,000	1,199		0,210	0,485
	Tag 10	1,655	1,472	1,045	0,472	3,262	6,065		2,328	2,055
	Tag 14	6,739	6,494	9,440	8,101	6,701	5,917		7,232	1,298

Tabelle 3.6: Tabellarische Übersicht über die Gefäßdichte der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte unter Angabe der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichungen (STABW).

	MSC 1 - MSC 14	FCZ 1 - FCZ 14	MSC 1 - FCZ 1	MSC 14 - FCZ 14
Tag 7	0,012	0,385	0,153	0,011
Tag 10	0,011	0,024	0,001	0,069
Tag 14	0,020	0,000	0,684	0,980

Tabelle 3.7: Übersicht über die Signifikanz (p-value) der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte zueinander.

Zusammenfassend zeigten die mesenchymalen Stammzell-Konstrukte bzw. die Meniskuszell-Konstrukte gruppenspezifische Eigenheiten:

Betrachtet man die Ergebnisse am Versuchsende (d 14), so zeigte sich, dass vorkultivierte Zell-Matrix-Konstrukte, sowohl mit mesenchymalen Stammzellen als auch mit Meniskuszellen besetzt (MSC 14 und FCZ 14), ein signifikant größeres angiogenetisches bzw. angiostatistisches Potential mit im Mittel ähnlich hohen Dichtewerten bei Versuchsende (um $7,2 \text{ mm}^{-1}$) besitzen als nicht vorkultivierte Zell-Matrix-Konstrukte (MSC 1 und FCZ 1) mit geringeren Gefäßdichte-Mittelwerten (um $2,5 \text{ mm}^{-1}$). Sowohl die mesenchymalen Stammzell-Konstrukte aber auch die Meniskuszell-Konstrukte verhielten sich innerhalb ihrer Zellart signifikant ($p < 0,05$) zueinander. Differenzierte initiierten also mehr Gefäßwachstum als undifferenzierte Zellen.

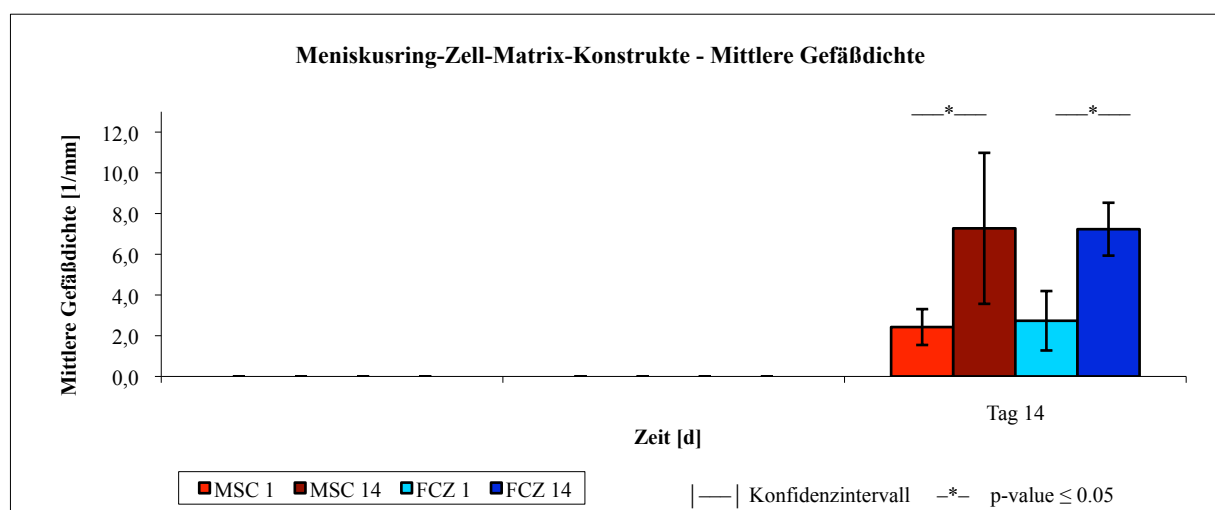


Tabelle 3.8: Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte am vierzehnten Versuchstag unter Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

Betrachtet man die Gefäßdichte im zeitlichen Verlauf, so zeigte sich in allen Gruppen eine signifikante Zunahme der Gefäßdichte von Tag 7 zu Tag 14. Nicht vorkultivierte mesenchymale Stammzell-Matrix-Konstrukte (MSC 1) initiierten ein signifikant ($p < 0,05$) früheres Einwachsen von Gefäßen als nicht vorkultivierte Meniskuszell-Matrix-Konstrukte (FCZ 1). Auch vorkultivierte Stammzell-Matrix-Konstrukte (MSC 14) zeigten im Gegensatz zu vorkultivierten Meniskuszell-Matrix-Konstrukten (FCZ 14) ein tendenziell, jedoch nicht signifikant ($p = 0,069$) früheres Einsprossen von Gefäßen. Mit mesenchymalen Stammzellen besetzte Zell-Matrix-Konstrukte veranlassten gegenüber den mit

Meniskuszellen besetzten Zell-Matrix-Konstrukten früher ein Gefäßwachstum.

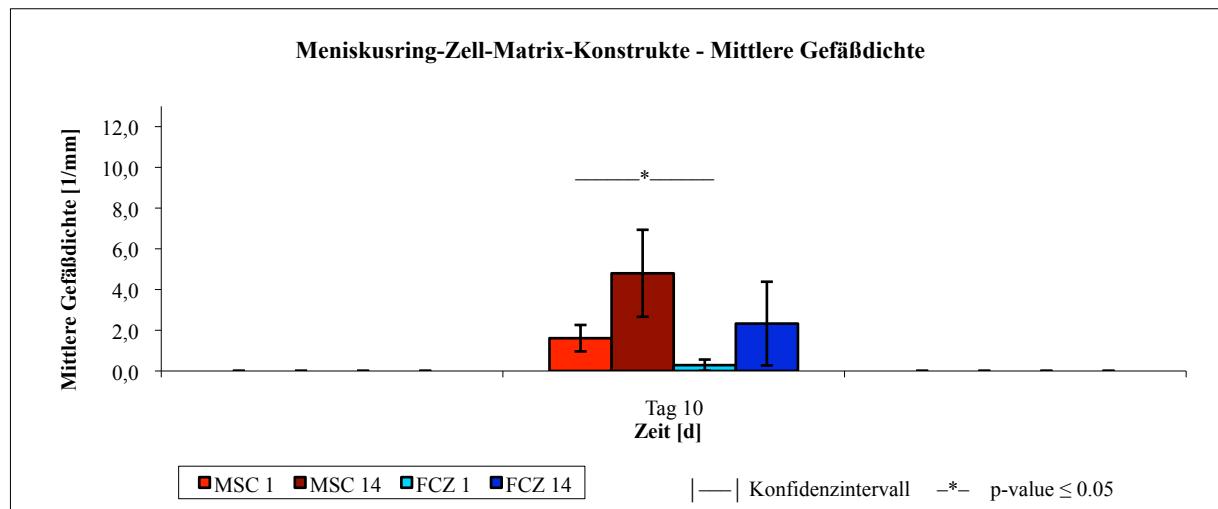


Tabelle 3.9: Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte am zehnten Versuchstag unter Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

Zusätzlich wurde jedes Konstrukt noch in eine dem avaskulären Meniskus und in eine dem vaskulären Meniskus zugewandte Hälfte unterteilt. Die Auswertung der Gefäßdichte wird in den Tabellen 3.10 bis 3.14 dargestellt. Während in beiden eintägig vorkultivierten Versuchsgruppen der Neovaskularisationsgrad der avaskulären Matrixhälfte sowohl an Tag 7, 10 und 14 überwiegt, zeigen die vaskulären Matrixhälften beider vierzehntägig vorkultivierter Gruppen bei Versuchsende ein stärkeres Gefäßwachstum als die avaskuläre Gegenseite. Jedoch fand sich auch hier eine frühere Angiogeneseinitiation auf der avaskulären Seite.

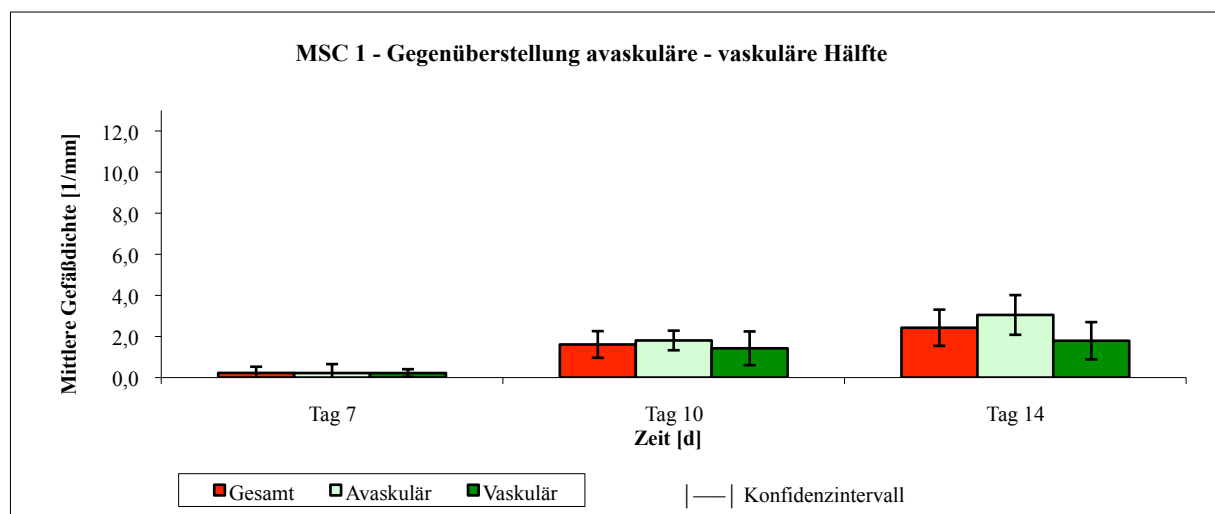


Tabelle 3.10: Grafische Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der nicht vorkultivierten mesenchymalen Stammzell-Matrix-Konstrukte (MSC 1) mit Unterteilung in dem avaskulären Meniskus und dem vaskulären Meniskus zugewandte Hälften. Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

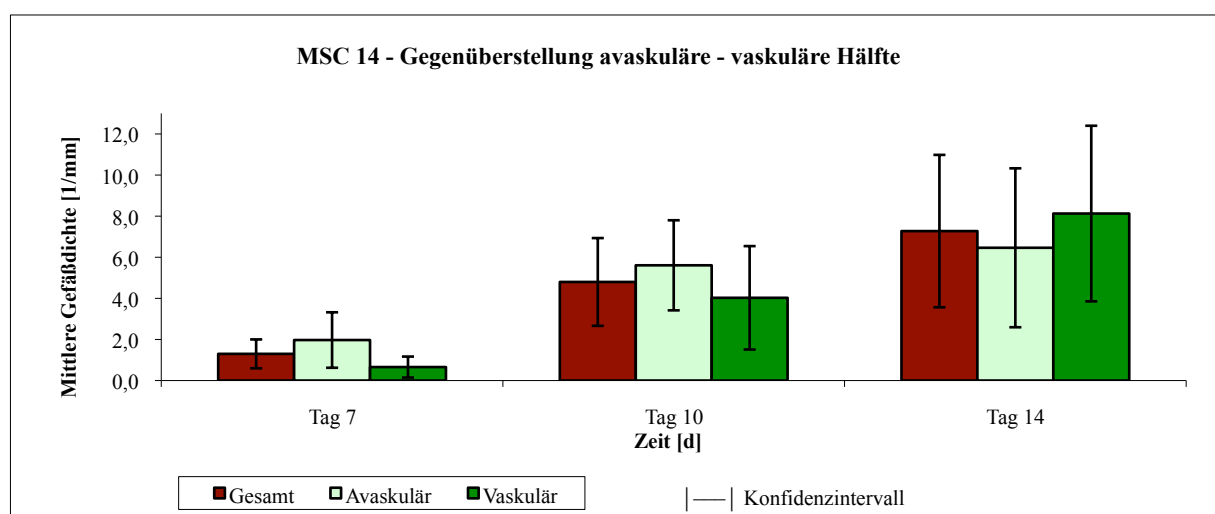


Tabelle 3.11: Grafische Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der vorkultivierten mesenchymalen Stammzell-Matrix-Konstrukte (MSC 14) mit Unterteilung in dem avaskulären Meniskus und dem vaskulären Meniskus zugewandte Hälften. Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

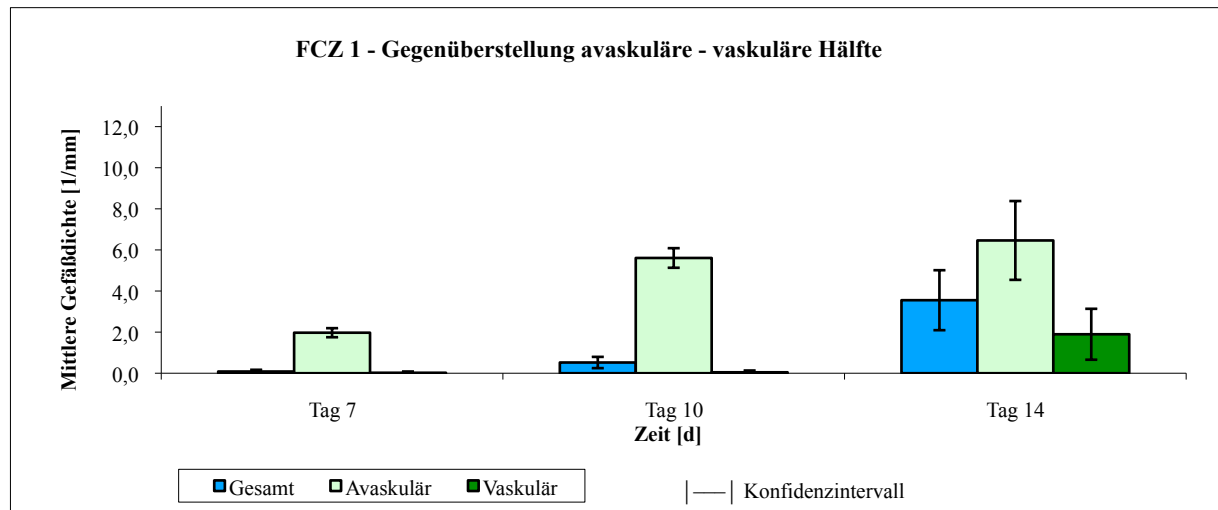


Tabelle 3.12: Grafische Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der nicht vorkultivierten Meniskuszell-Matrix-Konstrukte (FCZ 1) mit Unterteilung in dem avaskulären Meniskus und dem vaskulären Meniskus zugewandte Hälften. Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

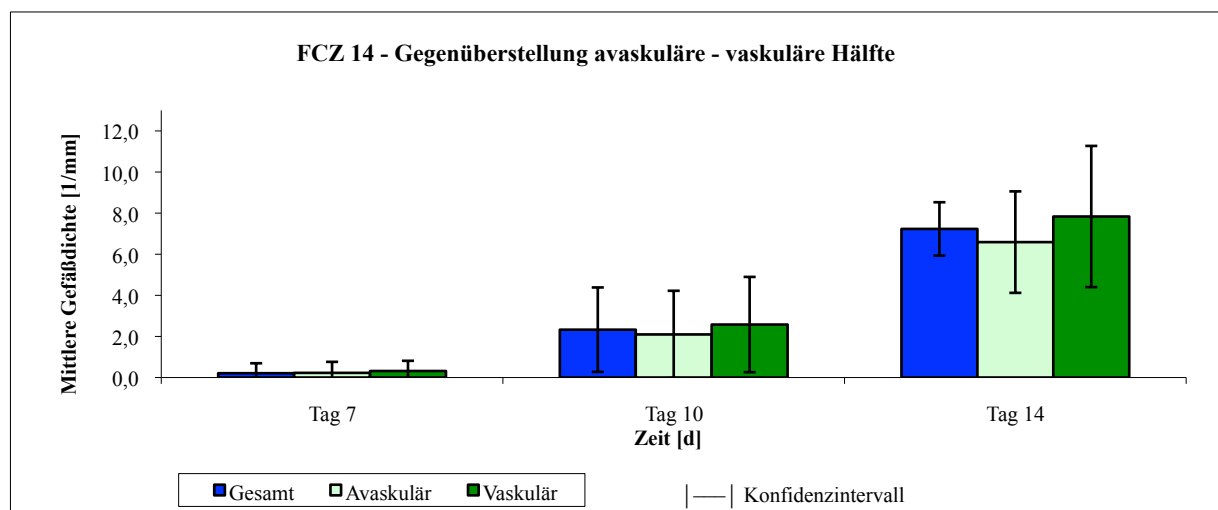


Tabelle 3.13: Grafische Zusammenstellung der mittleren Gefäßdichte der vorkultivierten Meniskuszell-Matrix-Konstrukte (FCZ 14) mit Unterteilung in dem avaskulären Meniskus und dem vaskulären Meniskus zugewandte Hälften. Berücksichtigung der Streuung der Einzelwerte.

Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm^{-1}]							MW	STABW
MSC 1 Avaskulär n = 5	Tag 7	0,000	0,000	0,996	0,109	0,000			0,221	0,436
	Tag 10	1,155	1,736	2,463	1,999	1,684			1,807	0,478
	Tag 14	1,409	3,332	3,294	3,228	3,982			3,049	0,966
MSC 1 Vaskulär n = 5	Tag 7	0,000	0,303	0,483	0,099	0,224			0,222	0,186
	Tag 10	0,335	1,447	2,626	1,526	1,191			1,425	0,821
	Tag 14	0,523	1,908	1,281	2,735	2,514			1,792	0,908
Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm^{-1}]							MW	STABW
MSC 14 Avaskulär n = 6	Tag 7	1,106	4,127	1,139	0,808	1,484	3,168		1,972	1,350
	Tag 10	5,594	9,642	5,966	5,046	3,823	3,581		5,609	2,191
	Tag 14	3,252	10,296	12,393	3,918	4,604	4,304		6,461	3,867
MSC 14 Vaskulär n = 6	Tag 7	0,289	0,619	0,059	1,551	0,744	0,678		0,657	0,510
	Tag 10	2,388	6,307	4,433	7,598	2,022	1,412		4,027	2,516
	Tag 14	11,734	11,532	12,718	4,265	4,853	3,661		8,127	4,272
Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm^{-1}]							MW	STABW
FCZ 1 Avaskulär n = 7	Tag 7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,583	0,083	0,220
	Tag 10	0,000	0,000	0,607	0,492	0,884	0,342	1,327	0,522	0,477
	Tag 14	1,169	1,990	1,556	4,977	4,489	5,898	4,796	3,554	1,918
FCZ 1 Vaskulär n = 7	Tag 7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,159	0,000	0,023	0,060
	Tag 10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,092	0,226	0,045	0,087
	Tag 14	1,146	1,243	1,005	3,817	0,591	3,294	2,177	1,896	1,239
Gruppe	Tag	Einzelwerte Gefäßdichte [mm^{-1}]							MW	STABW
FCZ 14 Avaskulär n = 6	Tag 7	0,000	0,039	0,000	0,000	0,000	1,321		0,227	0,536
	Tag 10	0,157	2,419	0,542	0,548	3,293	5,624		2,097	2,124
	Tag 14	5,036	6,634	4,500	11,277	5,290	6,800		6,590	2,469
FCZ 14 Vaskulär n = 6	Tag 7	0,000	0,000	0,846	0,000	0,000	1,059		0,318	0,496
	Tag 10	3,230	0,525	1,520	0,396	3,230	6,568		2,578	2,318
	Tag 14	8,530	6,354	14,102	4,939	8,177	4,908		7,835	3,436

Tabelle 3.14: Tabellarische Übersicht über die Gefäßdichte der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte unter Berücksichtigung der avaskulären und vaskulären Meniskushälft. Es werden auch die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) angegeben.

3.2 Histologischer Angiogenesenachweis

Zur Bestätigung der intravitalmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse wurden die verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte nach Versuchsende (d 14) histologisch aufgearbeitet (siehe 2.2.4). Mittels Toluidinblau gefärbten Gewebeschnitten wurde der Differenzierungsgrad des Reparaturgewebes evaluiert. Der Nachweis vaskulärer Strukturen wurde durch einen unspezifischen, erythrozytären Peroxidasenachweis mittels DAB ergänzt.

Es konnten in allen Implantaten (MSC 1, MSC 14, FCZ 1, FCZ 14) Gefäßanschnitte mit darin enthaltenen Erythrozyten dargestellt werden. Die Gefäße fanden sich sowohl in der in vivo zwischen Deckglas und Implantat gelegenen Schicht als auch im Bereich der Matrices und am Implantatboden. Im kompakten, nativen Meniskusgewebe des Meniskusrings konnten dabei keinerlei Gefäße nachgewiesen werden. Die Matrices aller Konstrukte färbten sich ähnlich stark an und es zeigten sich Gefäße in den Matrices. Die vierzehntägig vorkultivierten Konstrukte (MSC 14 und FCZ 14) wiesen gegenüber den eintägig vorkultivierten Konstrukten (MSC 1 und FCZ 1) eine stärkere Differenzierung mit höherem Proteoglykangehalt auf, was durch die bessere metachromatische Färbung verdeutlicht wird. Stark differenzierte Matrixteile, welche v.a. in der Gruppe der vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen aber auch mesenchymalen Stammzellen besetzten Konstrukte (FCZ 14) gefunden werden konnten, verhielten sich wie das umgebende Meniskusgewebe und ließen kaum Gefäßeinsprossung in das Konstrukt selbst erkennen.

Zusammenfassend ließen die histologischen Angiogeneseuntersuchungen folgende Aussagen zu:

Qualitativ wiesen alle Implantatgruppen innerhalb ihrer Zell-Matrix-Konstrukte Gefäße auf. Vierzehntägig vorkultivierte Konstrukte zeichneten sich durch einen größeren Anteil an Proteoglykanen und damit durch eine stärkere Differenzierung aus. Bei stark differenzierten Matrixanteilen bestand im Vergleich zum restlichen Konstrukt bei hohem angiotaktischen Potential ein geringerer bis fehlender Neovaskularisationsgrad im Konstrukt selbst (siehe 3.6).

Die Abbildungen 3.12 bis 3.19 zeigen mit Toluidinblau bzw. DAB gefärbte Gewebeschnitte. Aufgrund der beschriebenen Fluoreszenzmarkierung (siehe 2.2.3.6) stellen sich die Erythrozyten in den Toluidinblau gefärbten Schnitten grün dar, während der Peroxidasenachweis mittels DAB zu einer tiefschwarzen Färbung führt.

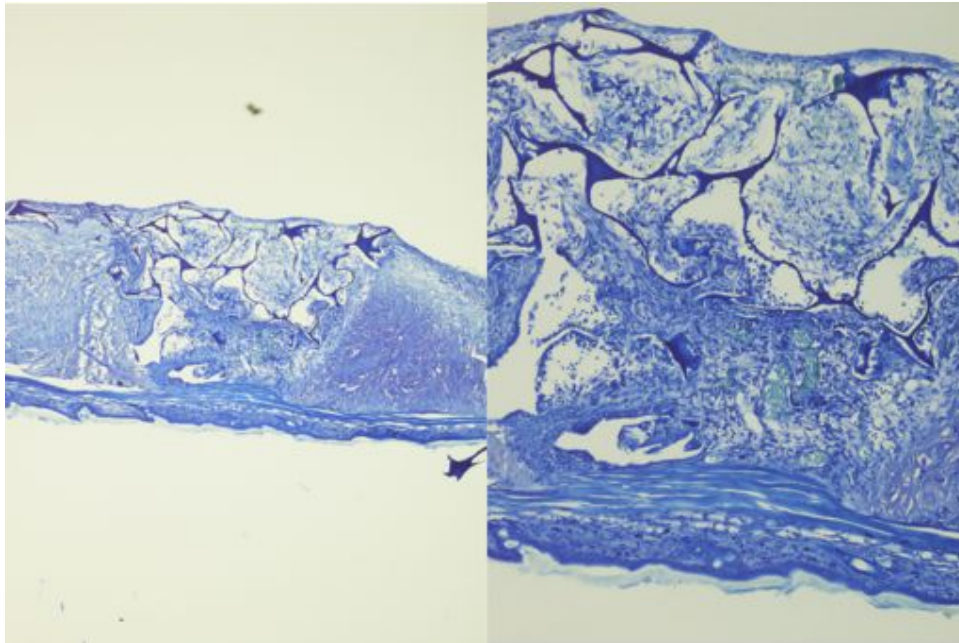


Abbildung 3.12: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 1) in Toluidinblau-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

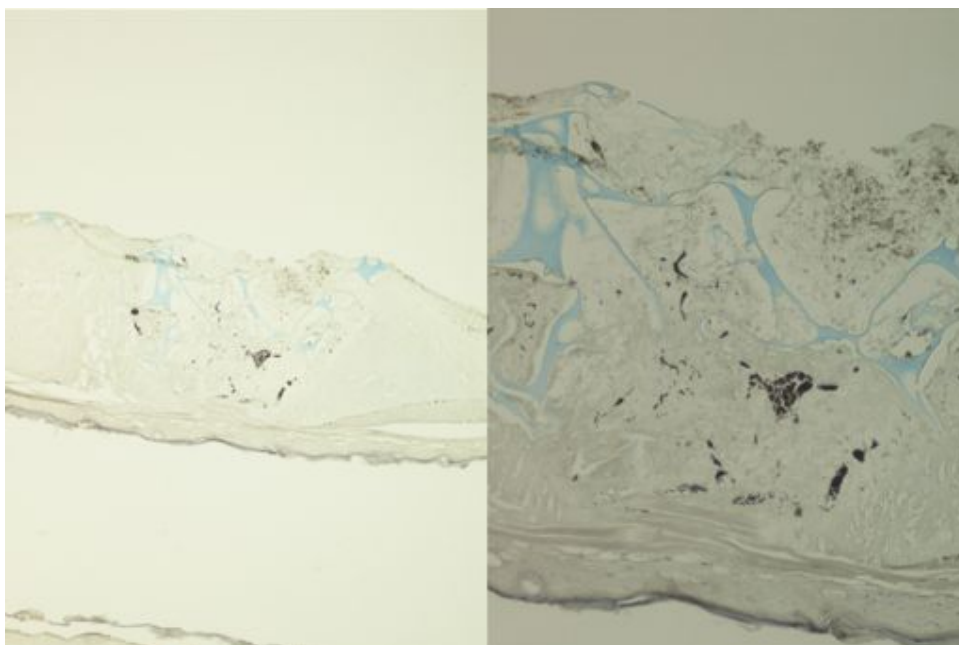


Abbildung 3.13: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 1) in DAB-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

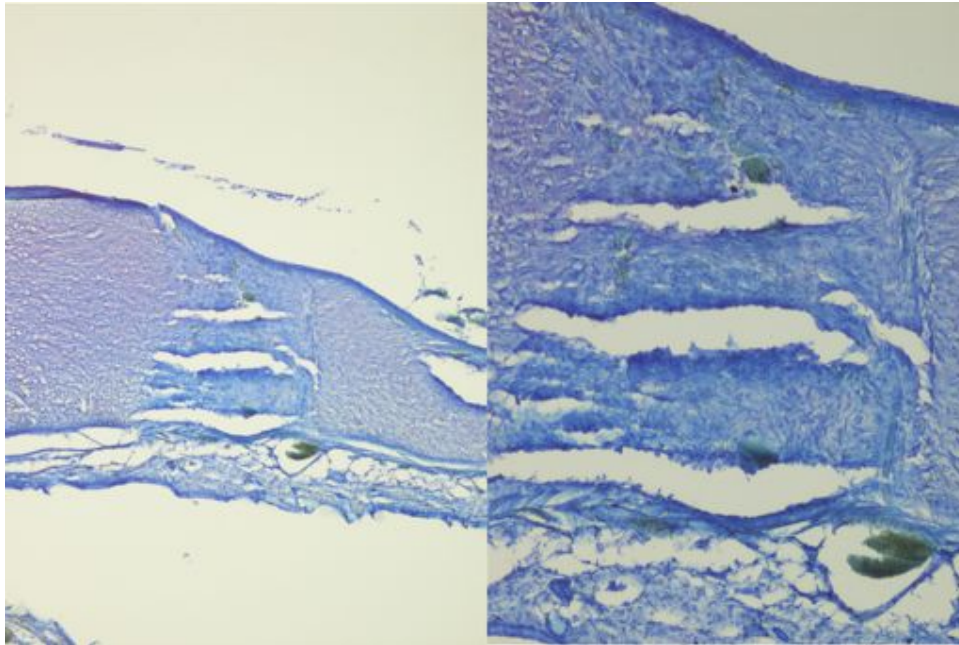


Abbildung 3.14: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 14) in Toluidinblau-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

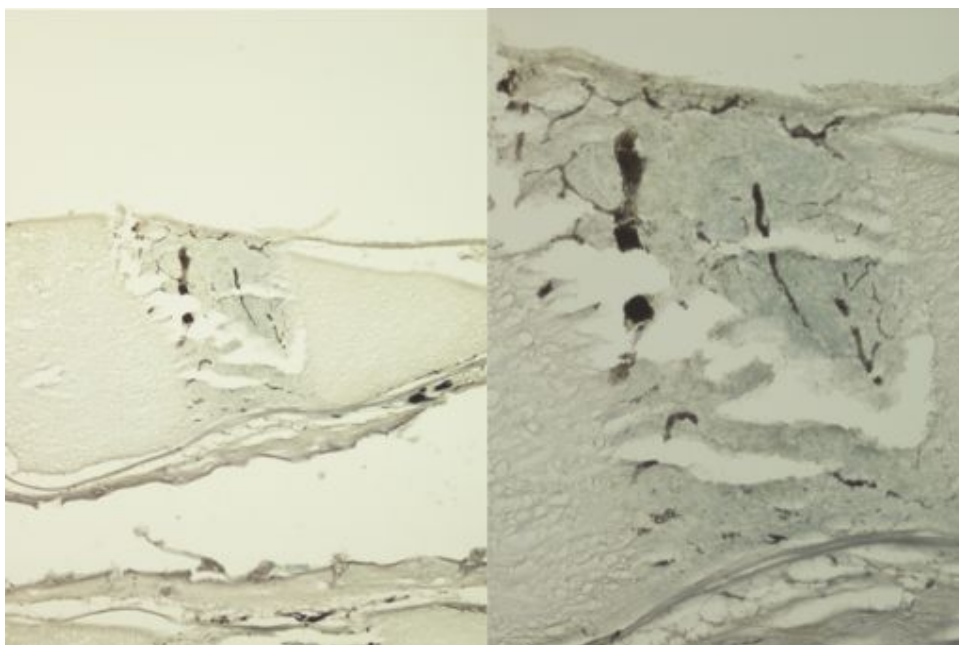


Abbildung 3.15: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 14) in DAB-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

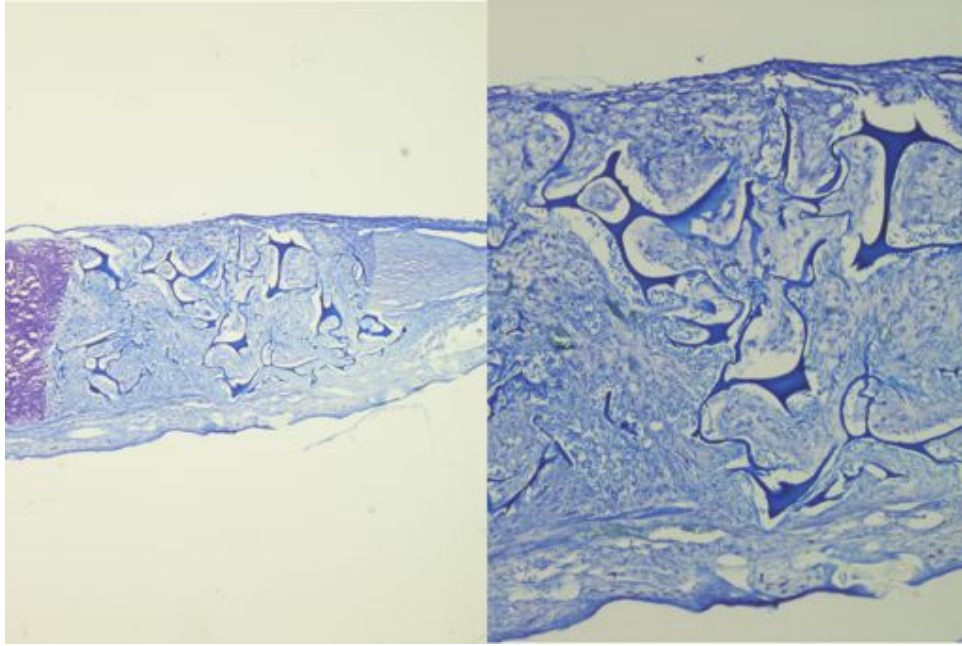


Abbildung 3.16: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 1) in Toluidinblau-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

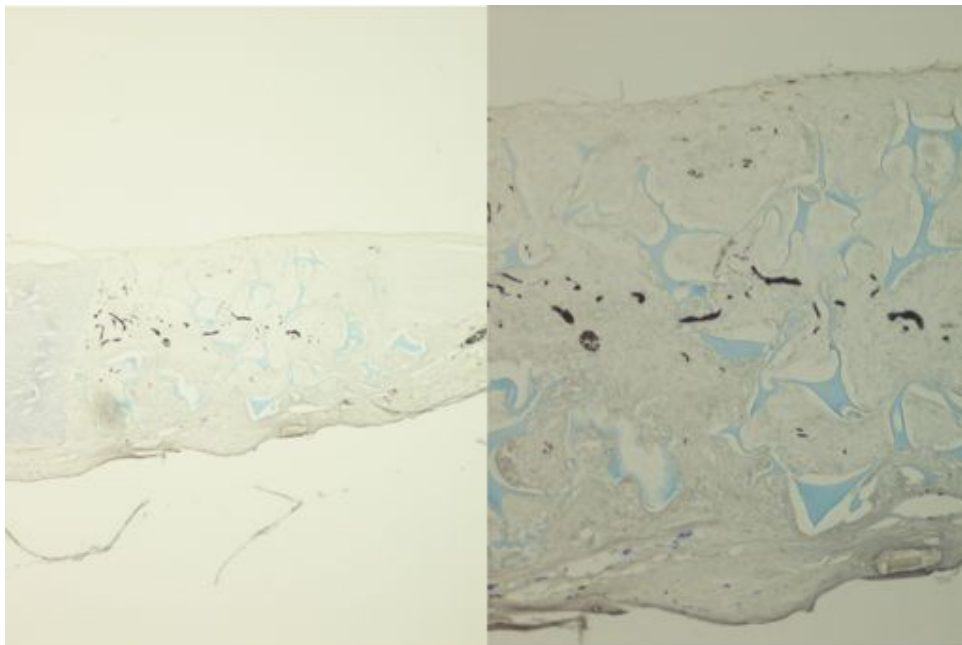


Abbildung 3.17: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 1) in DAB-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

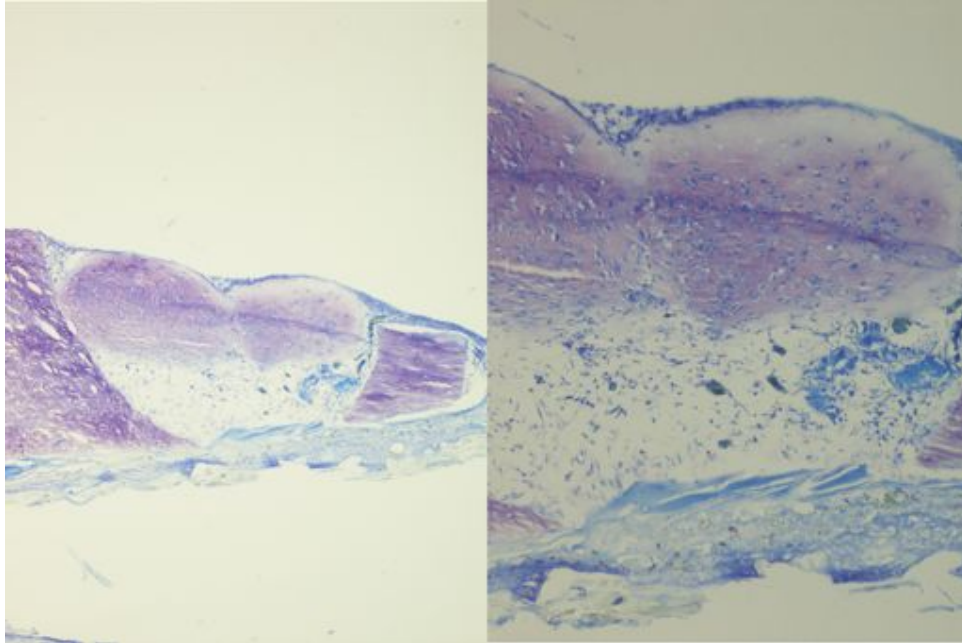


Abbildung 3.18: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 14) in Toluidinblau-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

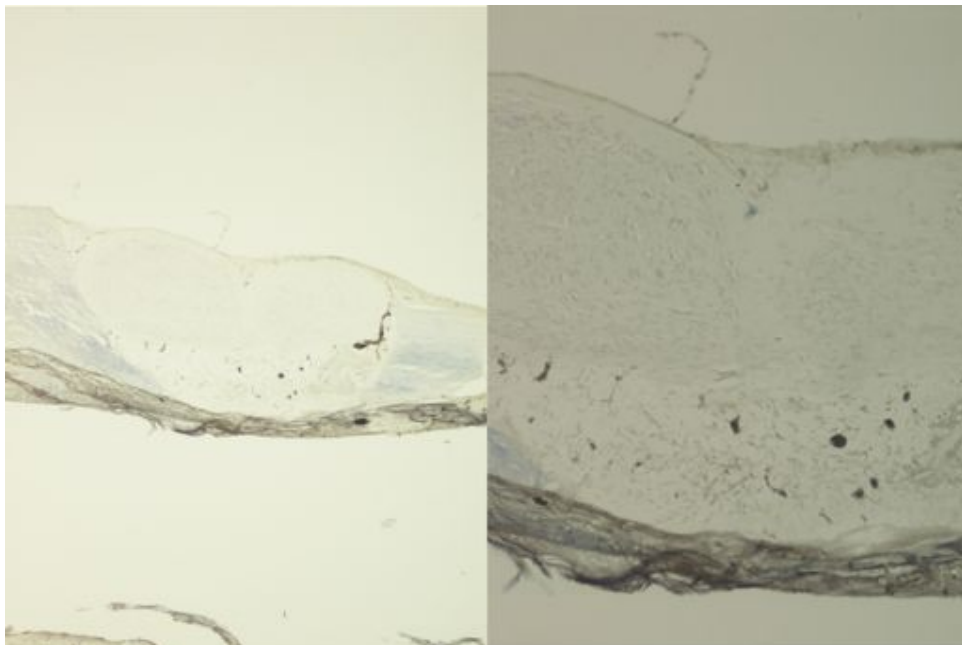


Abbildung 3.19: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 14) in DAB-Färbung in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

3.3 Gefäßfunktionabilität

Der Nachweis der Funktionabilität der in das Reparaturgewebe gewachsenen, neugebildeten Gefäße konnte über die Detektion des mit fluoreszenzmarkierten Erythrozyten angereicherten Blutes erbracht werden. Nach Anregung des intravenös applizierten und an Erythrozyten gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs wurde der Blutfluss innerhalb der Gefäße dokumentiert (siehe 2.2.3.6). Eine Erfolgskontrolle für die korrekte intravenöse Injektion wurde jeweils im unmittelbaren Anschluss durch fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von gelabelten Erythrozyten in bereits vorhandenen subkutanen Gefäßen durchgeführt.

Die Auswertung der täglichen Dokumentation brachte folgende Ergebnisse. Grundsätzlich in allen Konstrukten kam es zu Angiogenese. Diese war zunächst immer am Übergang freie Kammer - Meniskusring erkennbar. Im weiteren Verlauf fand eine Ausbreitung über die Meniskusoberfläche bis hin zu den Matrices statt. Der Nachweis einer Gefäßeinsprossung über die unten liegende, direkte Kontaktfläche (Subkutis der Maus – Matrix) war aufgrund des Versuchsaufbaus mit Mikroskopie von oben nicht möglich. Da in 16 Matrices von insgesamt 24 Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukten Angiogenese unabhängig vom Gefäßwachstum über die Meniskusoberfläche auftrat muss dieser Vorgang des direkten Einwachsens von unten jedoch postuliert werden. Im Detail war dies bei 4 von 5 MSC 1-Konstrukten, 6 von 6 MSC 14-Konstrukten, 1 von 7 FCZ 1-Konstrukten und 5 von 6 FCZ 14-Konstrukten beobachtbar.

Je nach Beschaffenheit des Konstrukts fanden sich die in Tabelle 3.15 aufgelisteten Zeiträume für Angiogenesebeginn und erstes Auftreten von Blutfluss (Funktionabilität).

Gruppe	Meniskusring		Zellbesetzte Matrix im Stanzdefekt	
	Angiogenesebeginn [Tag]	1. Blutfluss [Tag]	Angiogenesebeginn [Tag]	1. Blutfluss [Tag]
MSC 1 n = 5	3 - 5	7 - 8	6 - 9	9 - 13
MSC 14 n = 6	4 - 5	7 - 9	5 - 7	8 - 10
FCZ 1 n = 7	3 - 6	8	10 - 13	11 - 14
FCZ 14 n = 6	4 - 6	7 - 9	6 - 9	10

Tabelle 3.15: Tabellarische Übersicht über Angiogenesebeginn und erstes Auftreten von Blutfluss der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte. Unterscheidung von zellbesetzter Matrix und umgebendem Meniskusring.

Dabei waren in allen Matrices die neu gebildeten Gefäße im Übergangsbereich zum Meniskusring stärker konzentriert. Dementsprechend konnte vor allem hier ein Fluss in den entstandenen Gefäßen, also funktionierende Gefäße nachgewiesen werden.

Die Abbildungen 3.20 bis 3.23 zeigen eine Auswahl an intravitalmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte, sowie entsprechende, fluoreszenzmikroskopische Bildausschnitte in Vergrößerung.

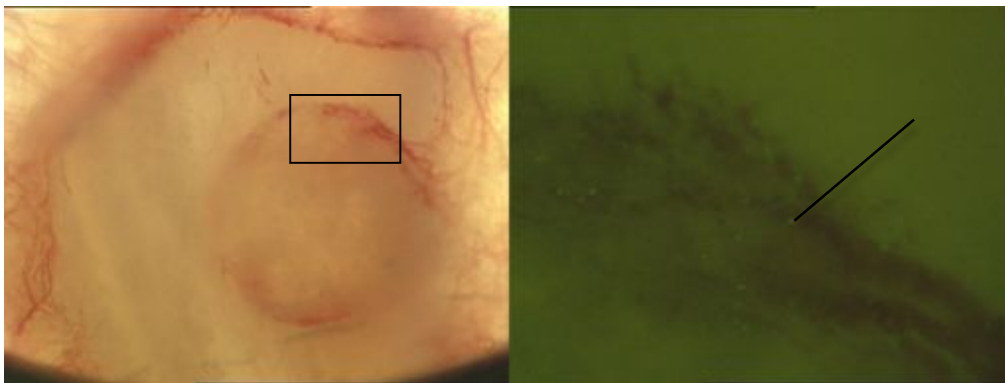


Abbildung 3.20: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 1) in der Rückenhautkammer (linkes Bild), sowie entsprechender fluoreszenzmikroskopischer Bildausschnitt in 20-facher Vergrößerung (rechts). Exemplarische Markierung von gelabelten Erythrozyten.

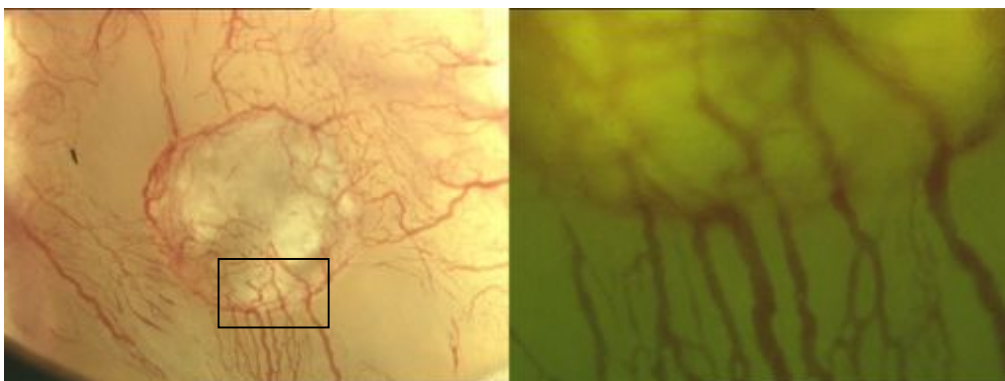


Abbildung 3.21: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 14) in der Rückenhautkammer (linkes Bild), sowie entsprechender fluoreszenzmikroskopischer Bildausschnitt in 10-facher Vergrößerung (rechts).

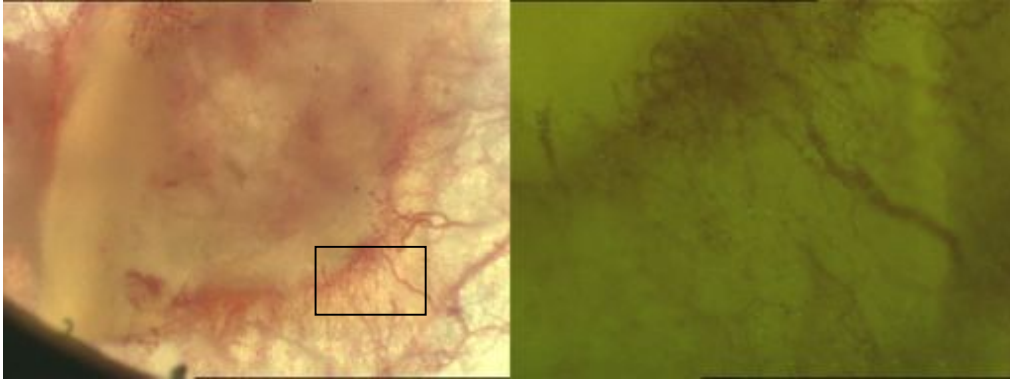


Abbildung 3.22: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 1) in der Rückenhautkammer (linkes Bild), sowie entsprechender fluoreszenzmikroskopischer Bildausschnitt in 10-facher Vergrößerung (rechts).

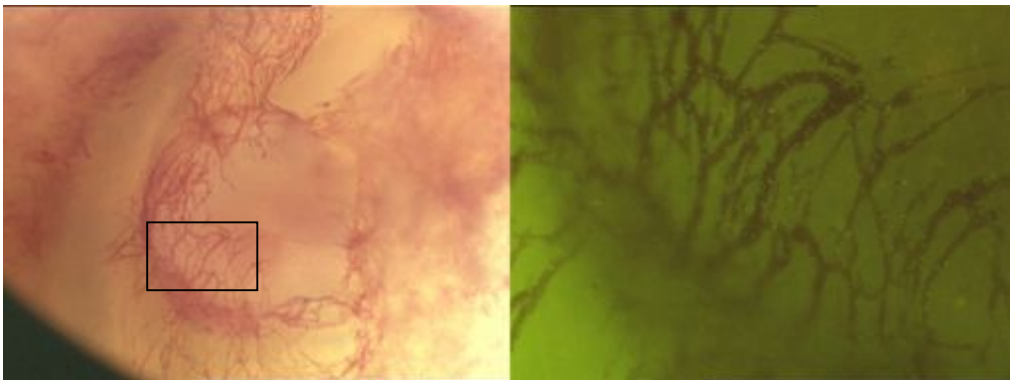


Abbildung 3.23: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 14) in der Rückenhautkammer (linkes Bild), sowie entsprechender fluoreszenzmikroskopischer Bildausschnitt in 10-facher Vergrößerung (rechts).

3.4 Histologischer Endostatinnachweis

Neben dem Angiogenesenachweis wurden die vorliegenden Gewebe auch immunhistochemisch auf eine Expression von Endostatin untersucht. Endostatin, ein 20 kDa schweres Spaltprodukt von Kollagen XVIII, ist ein direkter endogener Angiogenese-Inhibitor [122, 128].

Bei Auswertung der Gewebeschnitte waren die Füllungen nach Einsetzen von nicht vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukten der MSC 1 stark positiv für Endostatin gefärbt. Die der FCZ 1 waren ebenfalls deutlich, im Vergleich zu den der MSC 1 allerdings weniger Endostatin positiv. Die vierzehntägig vorkultivierten Gruppen ließen sich mit einem wesentlich geringerem Endostatingehalt davon noch einmal eindeutig abgrenzen. Die bisher noch nicht erwähnten, aber in manchen MSC 14 Matrices enthaltenen Nekroseareale färbten sich allerdings stark positiv an. Sie waren also entsprechend ihrem geringen Differenzierungsgrad endostatinreich. Demgegenüber zeigten stark differenzierte Matrixteile, welche v.a. in der Gruppe der vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Konstrukte (FCZ 14) gefunden werden konnten, nur einen geringen Gehalt an Endostatin.

Die Abbildungen Abb. 3.24 bis 3.27 zeigen auf Endostatin gefärbte Gewebeschnitte. Ein positiver Endostatinnachweis (siehe 2.2.5.1) führt zu einer tiefschwarzen Färbung.

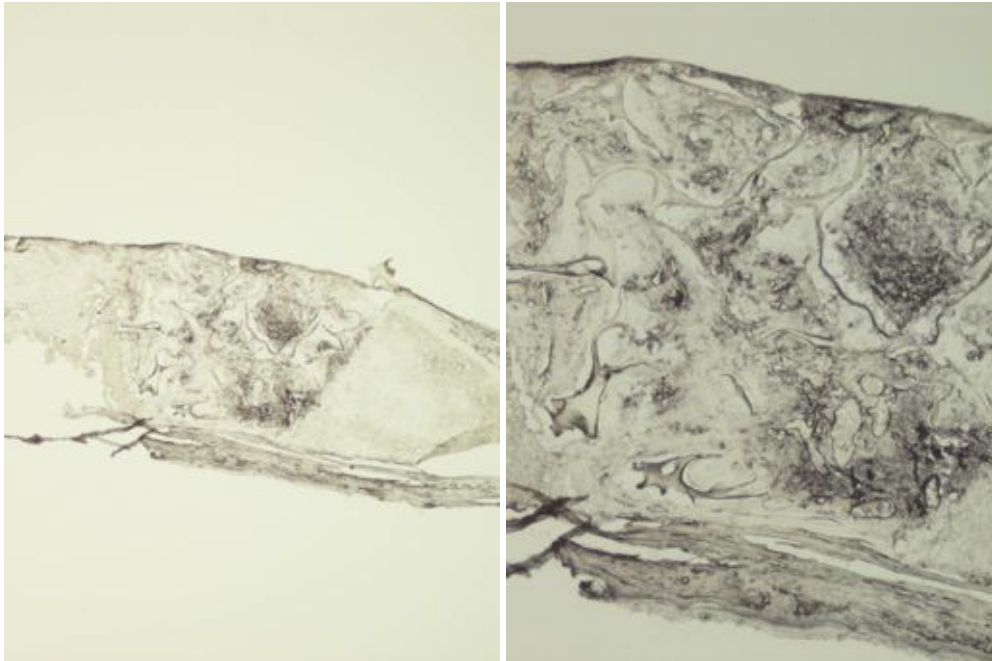


Abbildung 3.24: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 1) zum Endostatinnachweis in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

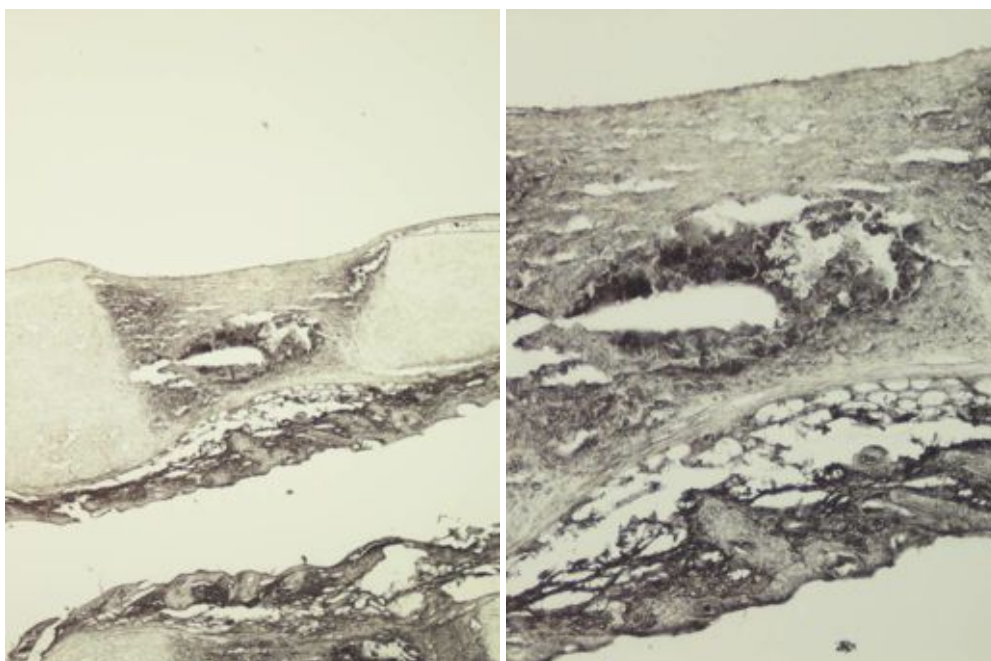


Abbildung 3.25: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (MSC 14) zum Endostatinnachweis in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten. Das Zell-Matrix-Konstrukt weist ein zentrales Nekroseareal auf.

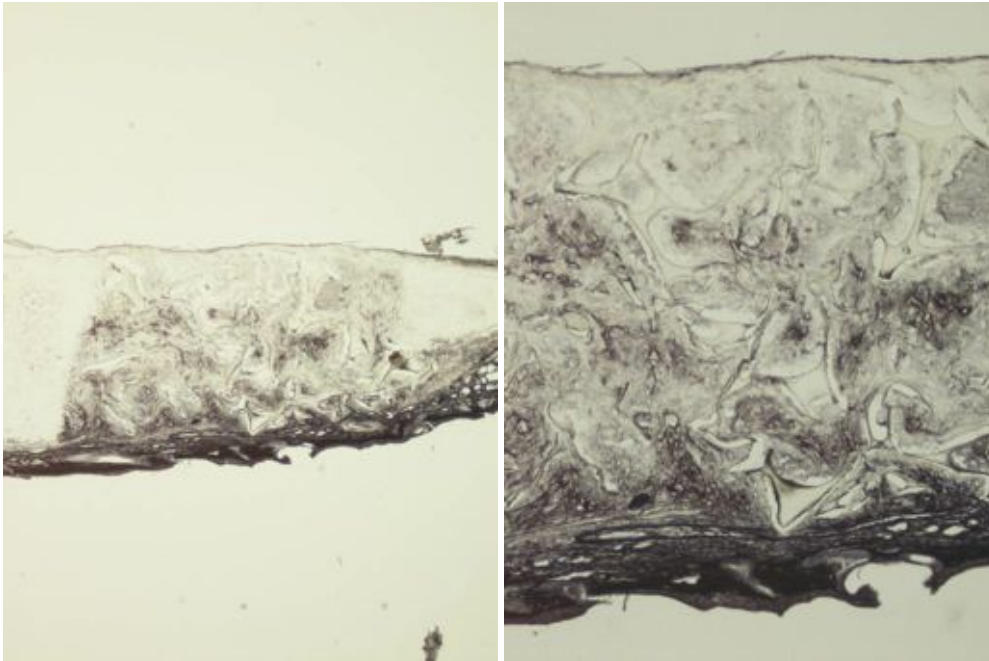


Abbildung 3.26: Lichtmikroskopische Aufnahme eines eintägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 1) zum Endostatinnachweis in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

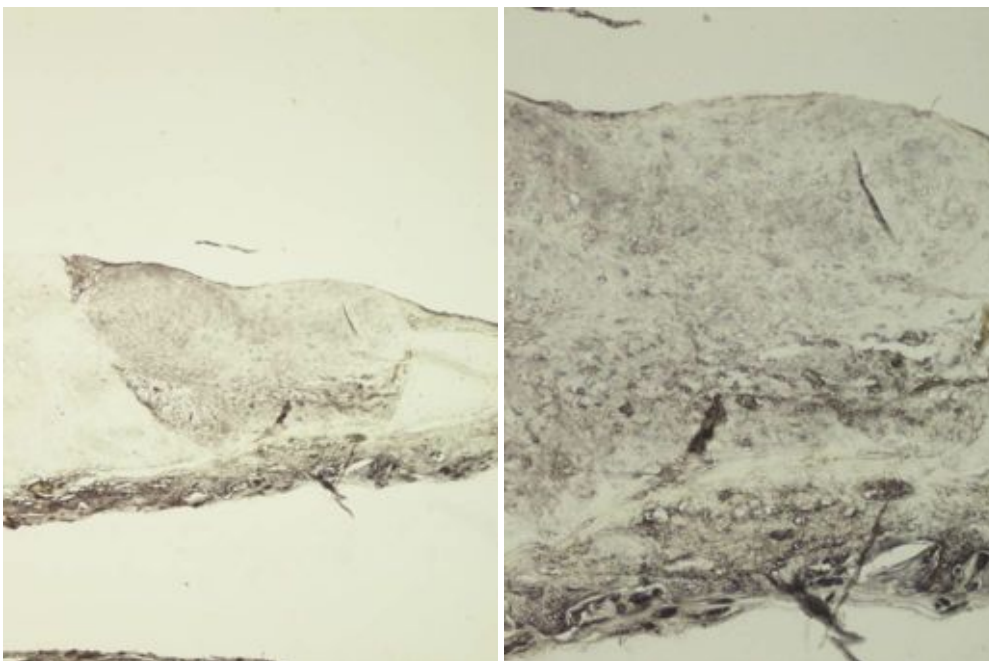


Abbildung 3.27: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukts (FCZ 14) zum Endostatinnachweis in 4- bzw. 10-facher Vergrößerung. In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten. Die obere Hälfte des Zell-Matrix-Konstrukts weist einen starken Differenzierungsgrad auf.

Endostatin als antiangiogenetischer Faktor wird in eintägig vorkultivierten Zellen stärker exprimiert. Mit zunehmenden Differenzierungsgrad des Reparaturgewebes (siehe 3.6) sinkt der Gehalt an Endostatin. Die Gefäßdichte und der Endostatingehalt verhalten sich in den untersuchten Geweben indirekt proportional. Matrices mit großem Neovaskularisationsgrad (MSC 14 und FCZ 14) zeichnen sich durch einen niedrigeren Endostatingehalt aus, wohingegen Gewebe mit geringerer Angiogenese (MSC 1 und FCZ 1) endostatinreicher sind.

3.5 Histologischer Integrationsnachweis

Die Beurteilung der Integration der Zell-Matrix-Konstrukte in ihre umgebenden Meniskusringe erfolgte mit Hilfe eines Integrationsscores. Die Einteilung erfolgte von „0 – 3“, wobei „0“ fehlende Integration, „1“ partielle einseitige Integration, „2“ beidseits partielle bzw. einseitig komplette Integration und „3“ komplette beidseitige Integration bedeutet.

Im Mittel fanden sich die in Tabelle 3.16 zusammengefassten Ergebnisse:

	Score	Avaskuläre Seite	Vaskuläre Seite
MSC 1	1	Keine Integration	Partielle Integration
MSC 14	2	Partielle Integration	Partielle Integration
FCZ 1	2	Keine Integration	Komplette Integration
FCZ 14	2	Partielle Integration	Partielle Integration

Tabelle 3.16: Tabellarische Übersicht über das Integrationsverhalten der verschiedenen Zell-Matrix-Konstrukte in ihre umgebenden Meniskusringe.

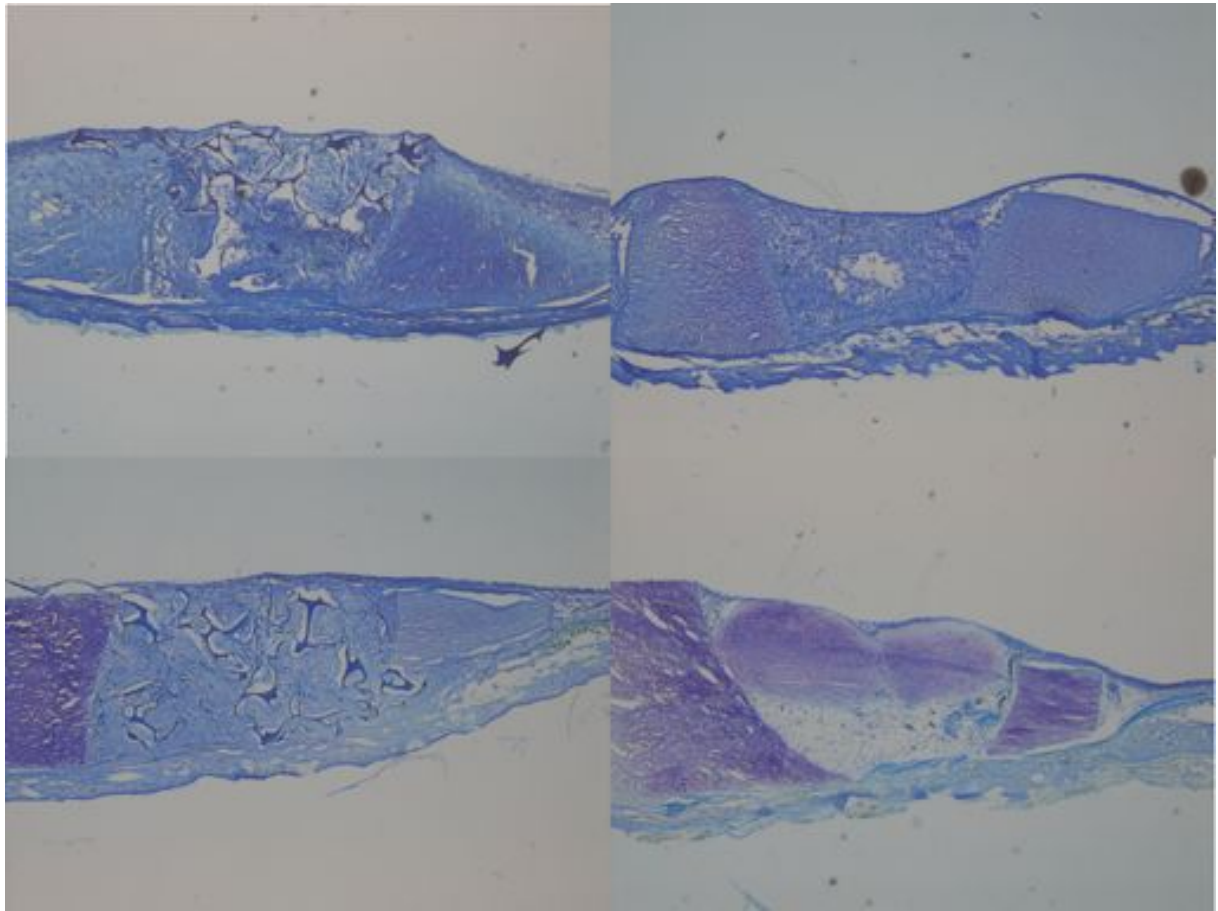
Insgesamt zeigten die MSC 14 die beste, die MSC 1 die geringste Integration. In allen Gruppen lässt sich tendenziell eine bessere Integration zur vaskulären Seite hin erkennen. Aufgrund des kurzen, 14 Tage dauernden in vivo Settings der Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte müssen die gewonnenen Ergebnisse allerdings vorbehaltlich betrachtet werden.

3.6 Differenzierungsverhalten

Die Toluidinblau gefärbten Gewebeschnitte wurden hinsichtlich einer Differenzierung der zellbesetzten Matrices untersucht. Als Zeichen der Bildung einer knorpeltypischen, proteoglykanreichen extrazellulären Matrixablagerung und damit als Zeichen einer stattgefundenen Differenzierung diente eine positive metachromatische Färbung.

Bei den MSC 1 waren die Matrixporen vereinzelt gut gefüllt, aber wenig differenziert. Die Matrixporen der FCZ 1 waren besser gefüllt, allerdings zeigte sich ebenfalls nur eine geringe Differenzierung. Die MSC 14 Matrices waren vereinzelt metachromatisch gefärbt, stellenweise waren auch Nekroseareale erkennbar. Im Gegensatz dazu waren die Matrices der FCZ 14 stark differenziert. Die zellbesetzten Matrices färbten sich hier zum Teil wie das umgebende Meniskusgewebe an.

Die Abbildung 3.28 zeigt eine Gegenüberstellung der verschiedenen Meniskusring-Zell-Matrix-Konstrukte hinsichtlich ihres Differenzierungsverhaltens.



Abbildungen 3.28: Lichtmikroskopische Aufnahme eines

- a) eintägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Konstrukts (MSC 1) links oben
- b) vierzehntägig vorkultivierten, mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Konstrukts (MSC 14) rechts oben
- c) eintägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Konstrukts (FCZ 1) links unten
- d) vierzehntägig vorkultivierten, mit Meniskuszellen besetzten Konstrukts (FCZ 14) rechts unten

In der 4-fachen Vergrößerung sind avaskuläre Meniskusteile im rechten, vaskuläre Meniskusteile im linken, sowie das Zell-Matrix-Konstrukt im mittleren Bilddrittel angeschnitten.

3.7 Zellviabilität

Die Vitalität der meniskalen Gewebe (Pellets und Meniskusringe) nach vierzehntägiger in vivo Laufzeit im Mausmodell wurde mittels eines Live/Dead® Kits aufgezeigt. Als Negativ- bzw. Totkontrolle diente ebenfalls am Versuchsende (Tag 14) entnommenes Meniskusgewebe, das vor der Inkubation mit dem Kit einem zweimaligem Einfrier- und Auftauvorgang in flüssigem Stickstoff ausgesetzt und dadurch abgetötet wurde.

Für den Nachweis machte man sich die Eigenschaft von Calcein-AM, durch die Zellmembran hindurch in lebende Zellen transportiert zu werden, zunutze. Nach dem Transport in die Zelle wird die Acetoxymethylgruppe unspezifisch durch Esterasen abgespalten, und in Calcein umgewandelt. Dieses ist dann in der Lage, Calciumionen innerhalb der Zelle zu binden (zu komplexieren), was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert.

Anders verhält es sich mit Ethidiumbromid. Dieses gelangt nur bei toten Zellen mit defekter Zellmembran ins Zellinnere. Es wird nicht von lebenden Zellen aufgenommen. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren intrazellulär zwischen die Basen der Nukleinsäuren, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und in einer starken, roten Fluoreszenz resultiert.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass der Nachweis mit Calcein-AM unspezifisch ist. Auch in der Totkontrolle fand eine zwar geringe aber doch sichtbare Umsetzung statt, erkennbar an der ebenfalls vorhandenen Fluoreszenz. Auch im toten Gewebe müssen noch unspezifische Esterasen wirksam sein (siehe Abbildung 3.29).

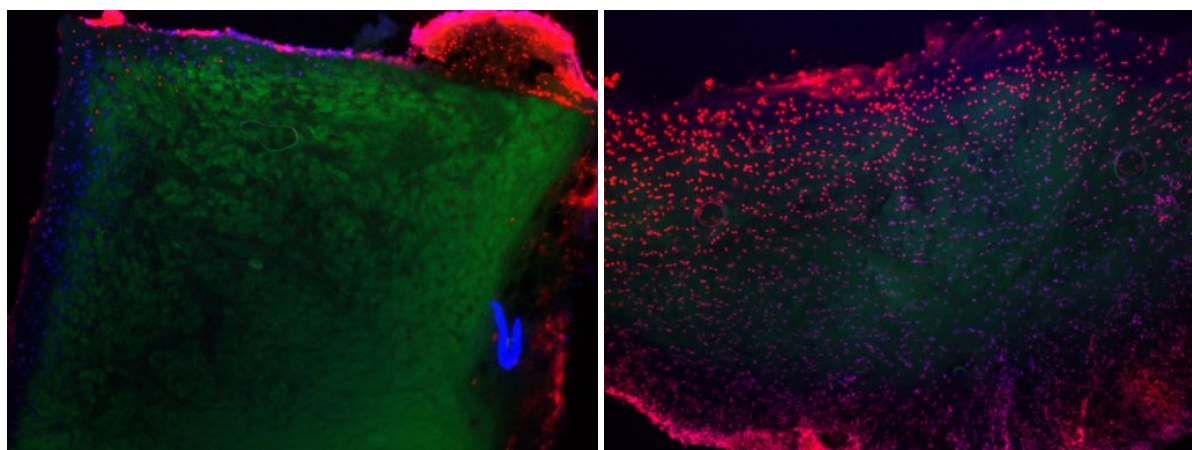


Abbildung 3.29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit dem Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit inkubierten Menisken in 10-facher Vergrößerung. Das linke Bild zeigt einen nach Versuchsende (Tag 14) explantierten und sofort inkubierten Meniskus, während das rechte Bild einen nach Versuchsende (Tag 14) explantierten und vor Inkubation abgetöteten Meniskus zeigt. Der vitale Meniskus links zeichnet sich durch eine wesentlich stärkere grüne Fluoreszenz aus, wobei jedoch auch im avitalen Gewebe rechts eine Umsetzung

von Calcein-AM stattfindet. Die rote Fluoreszenz ist eine Überlagerung bedingt durch zeitgleich durchgeführte Inkubation mit Ethidiumbromid (siehe unten).

Betrachtete man den vitalen Meniskus, fiel zur Meniskusspitze, die dem avaskulären Teil entspricht, abgesehen vom Randbereich eine geringe bis fehlende Fluoreszenzfärbung auf. Der Anteil an Esterasen war hier erniedrigt, der avaskuläre zeigte gegenüber dem vaskulären Meniskus eine geringere Stoffwechselaktivität (siehe Abbildung 3.30).

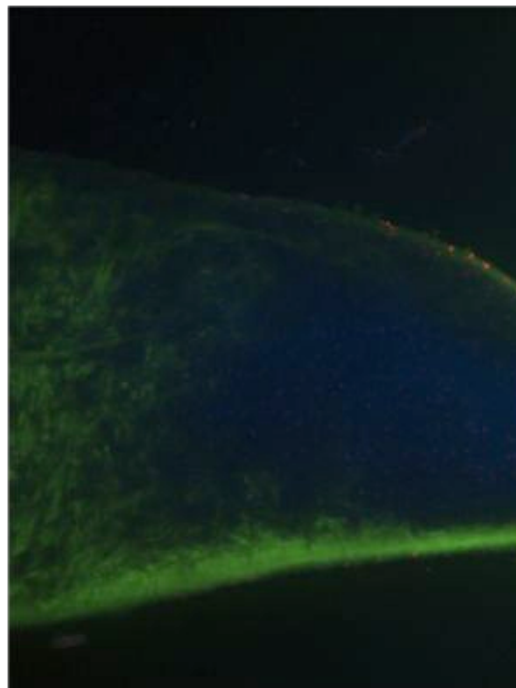


Abbildung 3.30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines vierzehntägig in der Rückenhautkammer belassenen Meniskus zum Vitalitätsnachweis in 10-facher Vergrößerung. Die grüne Fluoreszenzfärbung resultiert aus der Umsetzung von Calcein-AM zu Calcein durch unspezifische Esterasen. Vaskuläre Meniskusanteile der linken Bildhälfte unterscheiden sich hinsichtlich ihres Esterasengehalts deutlich von avaskulären Meniskusanteilen der rechten Bildhälfte.

Während Ethidiumbromid im vitalen Meniskusgewebe nur im Randbereich nachgewiesen werden konnte, war die Totkontrolle flächendeckend stark positiv gefärbt. Der Vitalitätsbeweis, dass Meniskus auch nach vierzehn in vivo Tagen lebt, war erbracht (siehe Abbildung 3.31).

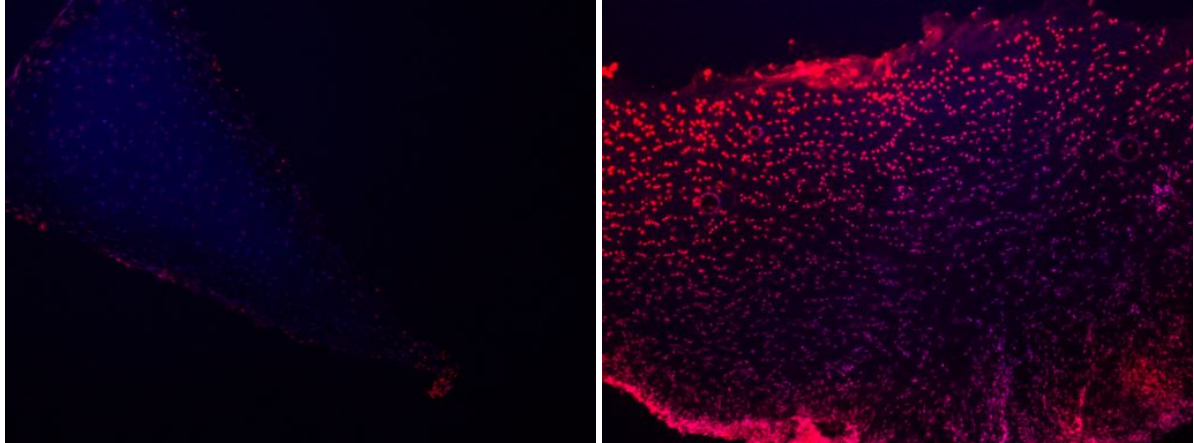


Abbildung 3.31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit dem Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit inkubierten Menisken in 10-facher Vergrößerung. Das linke Bild zeigt einen nach Versuchsende (Tag 14) explantierten und sofort inkubierten Meniskus, während das rechte Bild einen nach Versuchsende (Tag 14) explantierten und vor Inkubation abgetöteten Meniskus zeigt. Der avitale Meniskus rechts zeichnet sich durch einen wesentlich höheren Gehalt an intrazellulärem Ethidiumbromid aus.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendete Zellart einerseits, der Differenzierungsgrad der einzelnen Zell-Matrix-Konstrukte andererseits das Angiogeneseverhalten in einem Meniskusdefektreparaturmodell beeinflusst.

Mesenchymale Stammzellen zeigen hierbei eine frühere Initiierung der Neovaskularisation als Meniskuszellen vor allem im nicht vorkultivierten Zustand.

Im vorkultivierten Zustand zeigen mesenchymale Stammzellen eine deutlich höhere Initiierung der Neoangiogenese als im nicht vorkultivierten Zustand im vorliegenden Nacktmaus-Rückenkammer-Modell.

Als sogenannte Vorläuferzellen dienen Stammzellen dementsprechend in vielfältiger Weise der Heilung verletzter Gewebe. So konnte ein positiver Effekt in der Therapie von Myokardinfarkt, Apoplex, aber auch im Bereich des Bewegungsapparats und hier insbesondere bei der Reparatur von Knorpel- und Meniskusverletzungen belegt werden. Die Wirkungsweise der mesenchymalen Stammzellen ist dabei vielschichtig. Einerseits ist eine direkte Umwandlung der Stammzelle in die Reparaturzelle möglich, andererseits wird durch Bereitstellung bioaktiver Mediatoren indirekt Einfluss genommen [129]. Diese sezernierten Faktoren haben eine lokal immunsupprimierende Wirkung, fördern die Gewebedifferenzierung und unterdrücken die Entstehung von Narbengewebe. Im Besonderen nehmen diese Faktoren jedoch Einfluss auf die Steigerung der Angiogenese.

Tang und Kollegen konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen implantiert in ein ischämisches Myokardgebiet nach Myokardinfarkt die Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) förderten, die Gefäßdichte und den Blutfluß erhöhten und die Zellapoptoserate senkten. Dies führten die Autoren auf eine Sekretion bioaktiver Substanzen wie z.B. SDF-1 [130] zurück, jedoch konnten sie auch die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Endothelzellen zeigen [131].

Auch im Bereich des Meniskus konnte der positive therapeutische Effekt mesenchymaler Stammzellen mehrfach nachgewiesen werden. So konnten Murphy et al. 2003 zeigen, dass die Injektion von mesenchymalen Stammzellen mit Hyaluronsäure zu einer teilweisen Regeneration des partiell resezierten Meniskus führte. Die markierten mesenchymalen Stammzellen konnten sogar teilweise im Regenerat nachgewiesen und eine Zunahme der Angiogenese gezeigt werden [132].

Angele et al. konnten im Kaninchenmodell zeigen, dass durch die Behandlung mit MSCs und

einer Matrix auf Kollagen-Hyaluronsäurebasis ein kombinierter vaskulärer-avaskulärer Defekt nach Resektion der kompletten Pars intermedia des Außenmeniskus eine komplette Defektauffüllung mit differenziertem Reparaturgewebe möglich war [117].

Zellner und Kollegen setzten einen Stanzdefekt im Außenmeniskus von New Zealand White Rabbits im isolierten, rein avaskulären Bereich der Pars intermedia. Im Gegensatz zu einer Behandlung mit einer zellfreien Matrix auf Kollagen-Hyaluronsäurebasis, welche nur eine Auffüllung des Defekts mit fibrotischem Gewebe nach 3 Monaten in vivo zeigte, konnte durch die Behandlung des Defekts mit einem Konstrukt aus mesenchymalen Stammzellen und der Matrix eine gute Defektregeneration gezeigt werden. Die besseren Ergebnisse zeigte hier die Behandlung mit einem nicht vorkultivierten Stammzell-Matrix-Konstrukt. Der avaskuläre Meniskusdefekt war hierdurch nach 3 Monaten in vivo mit differenziertem, meniskusähnlichen Reparaturgewebe gefüllt, welches komplett in den nativen Meniskus integriert war. Auch durch die Therapie mit einem vorkultivierten Stammzell-Matrix-Konstrukt konnte eine gute Defektfüllung erreicht werden, jedoch war hier die Integration in das native Meniskusgewebe lediglich partiell [118].

Der Grad der Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen nimmt im vorliegenden Rückenhautkammer-Modell Einfluß auf die Neoangiogenese. Es ist anzunehmen, dass somit die Reparaturtendenz einer Meniskusläsion durch Tissue Engineering mit einer Matrix und mesenchymalen Stammzellen im mehr oder weniger differenzierten Zustand über die entsprechende Neovaskularisation beeinflusst wird.

Auch Meniskuszellen sowohl im vorkultivierten als auch im nicht vorkultivierten Zustand nehmen Einfluß auf die Angiogenese.

Hoberg et al. konnten zeigen das Meniskuszellen in vitro gut proliferieren und die Co-Kultur mit Endothelzellen/HUVEC-Zellen keinen Einfluß auf die Proliferationsrate der Fibrochondrozyten nahm. Allerdings konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass die Proliferationsrate der Endothelzellen durch die Co-Kultur mit Meniskuszellen stark reduziert und gehemmt wurde. Die Autoren erklärten dies durch die stark erhöhte Expression von Endostatin durch Fibrochondrozyten in Co-Kultur mit Endothelzellen [133].

Endostatin ist Teil des Kollagen XVIII Proteins und ein potenter antiangiogenetischer Faktor mit Rezeptoren sowohl an Endothel- als auch an mesenchymalen Zellen sowie Meniskuszellen. Endostatin wird auch von Meniskuszellen exprimiert [122, 128].

Auch im vorliegenden Modell ist eine Modulation der Angiogenese durch den

antiangiogenetischen Faktor Endostatin vorstellbar. Nach 14 Tagen in vivo wurde Endostatin in den angefertigten Gewebeschnitten histologisch bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl in den Meniskusringen, welche mit nicht vorkultivierten Meniskuszellen, aber auch in denjenigen, welche mit nicht vorkultivierten mesenchymalen Stammzellen behandelt wurden, im Regenerat deutlich mehr Endostatin nachgewiesen werden konnte als in den Meniskusringen, die mit den jeweiligen vorkultivierten Zellen behandelt wurden. Es erscheint möglich, dass die Behandlung mit nicht vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukten zu einer Überexpression des antiangiogenetischen Faktors Endostatin führt und somit die Neoangiogenese reduziert wird.

Nicht nur die Zellart und der Grad der Differenzierung des zellbasierten Tissue-Engineering Therapieansatzes zur Reparatur von Meniskusdefekten beeinflusst die Angiogenese sondern auch das Meniskusgewebe selbst nimmt Einfluß auf die Neovaskularisation.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Meniskuspellets aus unterschiedlichen Ursprungslokalisationen des Meniskus, nämlich aus dem inneren avaskulären und dem äußeren vaskulären Bereich in die Rückenhautkammer eingelegt und beobachtet.

Es zeigte sich, dass die Meniskuspellets aus dem vaskulären Bereich des Meniskus signifikant mehr Neoangiogenese induzierten als Meniskusgewebestücke, welche aus dem avaskulären Bereich stammten. Auch hier könnte der antiangiogenetische Faktor Endostatin eine Rolle spielen. Pufe et al. konnten nämlich zeigen, dass Meniskusgewebe aus dem avaskulären Bereich mehr Endostatin enthält als Meniskusgewebe im vaskularisierten Bereich [122]. Die vermehrte Hemmung der Neoangiogenese in vivo in der Rückenhautkammer der Nacktmaus durch Meniskusgewebe aus dem avaskulären Bereich könnte also auf die erhöhte lokale Freisetzung und damit Konzentration von antiangiogenetisch wirkendem Endostatin zurückzuführen sein. Durch den Nachweis, dass die Meniskusstücke auch nach 14 Tagen in der Rückenhautkammer vital waren, ist von einer aktiven sekretorischen Funktion des Meniskusgewebes auszugehen.

Dies würde ebenfalls bedeuten, dass der Meniskusring per se einen Einfluß auf die Angiogenese im Meniskusdefektmodell der Rückenhautkammer nimmt. Da der Meniskusring aber immer aus der gleichen, der avaskulären Region des Meniskus stammte, ist dessen Wirkung in allen Versuchsgruppen als gleich anzunehmen, so dass das unterschiedliche angiogenetische Verhalten auf die verschiedenen implantierten Zell-Matrix-Konstrukte zurückzuführen ist.

Neben Endostatin gibt es verschiedene andere Faktoren, die Angiogenese sowohl in vitro aber

auch in vivo beeinflussen können. Ein in der Literatur viel untersuchter Faktor ist VEGF (vascular endothelial growth factor). Dieser Faktor konnte ebenfalls in Meniskusgewebe nachgewiesen werden [134, 135]. Auf die Bestimmung von VEGF wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da ein eindeutiger Einfluß von VEGF auf die Meniskus-Vaskularisation und Reparatur nicht bewiesen ist. Vielmehr zeigten Hoberg et al., dass eine Co-Kultur von Meniskuszellen und Endothelzellen ohne Reaktion auf die VEGF Sekretion blieb [133]. Kopf und Kollegen verglichen in einem Schafmodell die Reparaturtendenz von avaskulären Meniskusläsionen unter dem Einfluss von VEGF. Hierfür wurden Meniskuslängsrisse im avaskulären Bereich mit einem normalen Faden genäht und gegen Meniskusrisse verglichen, die mit einem VEGF freisetzenden Faden versorgt wurden. Letztendlich zeigte sich in der Auswertung, dass durch VEGF keine Verbesserung der Meniskusheilung im avaskulären Bereich erreicht werden konnte, ja sogar eine tendenzielle Verschlechterung des Reparaturverhaltens eintrat. Diese Ergebnisse verdeutlichen umso mehr die Vielschichtigkeit einflussnehmender Faktoren auf die Neoangiogenese im Meniskusbereich [136].

Aufgrund dieser Vielschichtigkeit ebenso wie des kurzen Beobachtungszeitraums kann im vorliegenden Modell kein Anspruch auf Vollständigkeit der Analyse zur Neoangiogenese erhoben werden, was eine Schwäche des vorliegenden Modells ist.

Der Grad der Differenzierung des Zell-Matrix-Konstrukts scheint also ein entscheidender Faktor für die Beeinflussung der Neoangiogenese im Meniskus zu sein. Ein undifferenziertes Zell-Matrix-Konstrukt zeigt weniger Gefäßneubildung im Vergleich zu einem differenzierten Zell-Matrix-Konstrukt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob sich Neoangiogenese für die Regeneration eines avaskulären Gewebes positiv auswirkt. Wie bereits erwähnt konnten Zellner et al. [118] beim Kaninchen in einem Meniskusdefektmodell im avaskulären Bereich zeigen, dass durch ein nicht vorkultiviertes Zell-Matrix-Konstrukt bestehend aus mesenchymalen Stammzellen und einer Hyaluronsäure-Kollagen-Matrix, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde, eine Reparatur im avaskulären Meniskusbereich möglich ist. Im Gegensatz dazu zeigte ein vorkultiviertes Konstrukt Schwächen in der Integration des Reparaturgewebes in den umliegenden nativen Meniskus. Betrachtet man nun neben vielen weiteren Co-Faktoren die Angiogenese als wichtige Grösse für eine erfolgreiche Reparatur einer avaskulären Meniskusläsion, so würde dies bedeuten, dass eine eher vaskularisationshemmende und zellbasierte Therapie erfolgsversprechend ist, dass also wenig Gefäßeinsprossung für die Reparatur im avaskulären Meniskusanteil von Vorteil ist.

Um dies jedoch mit letztendlicher Sicherheit sagen zu können, müssen noch weitere

Untersuchungen folgen. Jedoch kann durch die entsprechende Wahl der Zellart und des Differenzierungsgrades dieser Zellen Einfluss auf die Angiogenese und somit eine Anpassung an das zu regenerierende Gewebe in unserem Fall an den avaskulären Meniskusbereich erfolgen.

5 Literatur

1. ZDF Länderspiegel. Gefährliches Hobby. ZDF Länderspiegel vom 30.08.2008. <http://laenderspiegel.zdf.de/ZDFde/inhalt/9/0,1872,7299337,00.html>.
2. Meyers Lexikon online. Extremsport. Online-Besuch vom 20.10.08. <http://lexikon.meyers.de/wissen/Extremsport+%28Sachartikel%29>.
3. Salz, J. and P. Steinkirchner, Adidas-Chef Herbert Hainer im Interview: Schlechtes Gewissen? Wieso? wiwo.de. Online-Besuch vom 20.10.08. <http://www.wiwo.de/unternehmer-maerkte/schlechtes-gewissen-wieso-301766/>.
4. Seidel, H., Fussball-EM 2008: Wie Grossveranstaltungen die Kunden in Deutschland zum Einkaufen treiben. Welt Online. Online-Besuch vom 20.10.08. http://www.welt.de/welt_print/article2064005/Die_Schokoseite_des_runden_Leders.html.
5. Simon, E.M., Robin Schuh mischt Nike & Co. auf. Spiegel Online. Online Besuch vom 09.10.2006. <http://www.spiegel.de/wirtschaft/0,1518,441291,00.html>.
6. Ueblacker, B., M. Gebauer, and M. Ziegler, Verletzungen und Fehlbelastungsfolgen im Sport. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2005. 48: p. 927-38.
7. Dandy, D.J., The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions. J Bone Joint Surg Br, 1990. 72(4): p. 628-33.
8. Poehling, G.G., D.S. Ruch, and S.J. Chabon, The landscape of meniscal injuries. Clin Sports Med, 1990. 9(3): p. 539-49.
9. Cox, J.S. and L.D. Cordell, The degenerative effects of medial meniscus tears in dogs' knees. Clin Orthop Relat Res, 1977(125): p. 236-42.
10. Cox, J.S., et al., The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. Clin Orthop Relat Res, 1975(109): p. 178-83.
11. Radin, E.L. and R.M. Rose, Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. Clin Orthop Relat Res, 1986(213): p. 34-40.
12. Weigel, B. and M. Nerlich, Praxisbuch Unfallchirurgie Band 1. Springer, 2005. 1. Auflage: p. 594-647.
13. Aufwendungen der GKV nach ausgewählten Leistungsarten 1992–2006. Sozialpolitik-aktuell. Online-Besuch vom 20.10.08. <http://www.sozialpolitik-aktuell.de/datensammlung/6/abb/abbVI24.pdf>.
14. Klauber, J., B.P. Robra, and H. Schellschmidt, Krankenhaus-Report 2003 Schwerpunkt: G-DRGs im Jahre 1 Kernaussagen der Beiträge. Online-Besuch vom 20.10.08. http://www.aok-gesundheitspartner.de/inc_ges/download/dl.php/bundesverband/krankenhaus/imperia/md/content/partnerkrankenhaus/pdf2/khr_kernaussagen.pdf.
15. Drenckhahn, D. and W. Zenker, Benninghoff Anatomie Makroskopische Anatomie. Urban & Schwarzenberg, 1994. 15. Auflage: p. 357-67.
16. Moll, K.J. and M. Moll, Anatomie Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. Urban & Fischer, 2000. 16. Auflage: p. 218-22.
17. Wrobel, K.H., Begleittext zum Kursus der makroskopischen Anatomie. Universität Regensburg, 1999. 8. Auflage p. 34-7.
18. Petersen, W., et al., The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. Arch Orthop Trauma Surg, 2007.

- 127(4): p. 235-40.
19. Armstrong, C.G. and V.C. Mow, Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. 64(1): p. 88-94.
20. Bourne, R.B., et al., The effect of medial meniscectomy on strain distribution in the proximal part of the tibia. *J Bone Joint Surg Am*, 1984. 66(9): p. 1431-7.
21. Fukubayashi, T., et al., An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation, and torque. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. 64(2): p. 258-64.
22. Walker, P.S. and M.J. Erkman, The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 1975(109): p. 184-92.
23. Kurosawa, H., T. Fukubayashi, and H. Nakajima, Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res*, 1980(149): p. 283-90.
24. Seedhom, B.B. and K. Terayama, Knee forces during the activity of getting out of a chair with and without the aid of arms. *Biomed Eng*, 1976. 11(8): p. 278-82.
25. Voloshin, A.S. and J. Wosk, Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng*, 1983. 5(2): p. 157-61.
26. Fukubayashi, T. and H. Kurosawa, The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints. *Acta Orthop Scand*, 1980. 51(6): p. 871-9.
27. Hsieh, H.H. and P.S. Walker, Stabilizing mechanisms of the loaded and unloaded knee joint. *J Bone Joint Surg Am*, 1976. 58(1): p. 87-93.
28. Levy, I.M., P.A. Torzilli, and R.F. Warren, The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. 64(6): p. 883-8.
29. Shoemaker, S.C. and K.L. Markolf, 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*, 1986. 68(1): p. 71-9.
30. Cooper, D.E., S.P. Arnoczky, and R.F. Warren, Meniscal repair. *Clin Sports Med*, 1991. 10(3): p. 529-48.
31. O'Connor, B.L., The mechanoreceptor innervation of the posterior attachments of the lateral meniscus of the dog knee joint. *J Anat*, 1984. 138 (Pt 1): p. 15-26.
32. Wilson, A.S., P.G. Legg, and J.C. McNeur, Studies on the innervation of the medial meniscus in the human knee joint. *Anat Rec*, 1969. 165(4): p. 485-91.
33. Arnoczky, S.P., R.F. Warren, and N. Kaplan, Meniscal remodeling following partial meniscectomy--an experimental study in the dog. *Arthroscopy*, 1985. 1(4): p. 247-52.
34. Arnoczky, S.P. and R.F. Warren, The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med*, 1983. 11(3): p. 131-41.
35. Heatley, F.W., The meniscus--can it be repaired? An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*, 1980. 62(3): p. 397-402.
36. Fairbank, T.J., Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br*, 1948. 30B(4): p. 664-70.
37. Ahmed, A.M. and D.L. Burke, In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints--Part I: Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng*, 1983. 105(3): p. 216-25.

38. Tissakht, M. and A.M. Ahmed, Tensile stress-strain characteristics of the human meniscal material. *J Biomech*, 1995. 28(4): p. 411-22.
39. Kim, J.M. and M.S. Moon, Effect of synovectomy upon regeneration of meniscus in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*, 1979(141): p. 287-94.
40. Klompmaker, J., et al., Porous polymer implants for repair of full-thickness defects of articular cartilage: an experimental study in rabbit and dog. *Biomaterials*, 1992. 13(9): p. 625-34.
41. Klompmaker, J., et al., Meniscal repair by fibrocartilage? An experimental study in the dog. *J Orthop Res*, 1992. 10(3): p. 359-70.
42. Klompmaker, J., et al., Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity. *Biomaterials*, 1996. 17(17): p. 1685-91.
43. Fox, J.M., K.G. Rintz, and R.D. Ferkel, Trephination of incomplete meniscal tears. *Arthroscopy*, 1993. 9(4): p. 451-5.
44. Zhang, Z., et al., Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats. *Am J Sports Med*, 1995. 23(1): p. 35-41.
45. Zhang, Z.N., et al., Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination. *Arthroscopy*, 1988. 4(3): p. 151-9.
46. Borner, C.E., et al., [Treatment of incomplete meniscal lesions in athletes]. *Sportverletz Sportschaden*, 2005. 19(4): p. 200-4.
47. Henning, C.E., M.A. Lynch, and J.R. Clark, Vascularity for healing of meniscus repairs. *Arthroscopy*, 1987. 3(1): p. 13-8.
48. Esser, R.D., Arthroscopic meniscus repair: the easy way. *Arthroscopy*, 1993. 9(2): p. 231-3.
49. Rodeo, S.A. and R.F. Warren, Meniscal repair using the outside-to-inside technique. *Clin Sports Med*, 1996. 15(3): p. 469-81.
50. van Trommel, M.F., et al., Arthroscopic meniscal repair with fibrin clot of complete radial tears of the lateral meniscus in the avascular zone. *Arthroscopy*, 1998. 14(4): p. 360-5.
51. Horibe, S., et al., Results of isolated meniscal repair evaluated by second-look arthroscopy. *Arthroscopy*, 1996. 12(2): p. 150-5.
52. Stone, R.G. and G.A. Miller, A technique of arthroscopic suture of torn menisci. *Arthroscopy*, 1985. 1(4): p. 226-32.
53. Maruyama, M., The all-inside meniscal suture technique using new instruments. *Arthroscopy*, 1996. 12(2): p. 256-8.
54. Morgan, C.D., The "all-inside" meniscus repair. *Arthroscopy*, 1991. 7(1): p. 120-5.
55. Starke, C., et al., Meniscal repair. *Arthroscopy*, 2009. 25(9): p. 1033-44.
56. Barber, F.A., et al., Biomechanical advantages of triple-loaded suture anchors compared with double-row rotator cuff repairs. *Arthroscopy*, 2010. 26(3): p. 316-23.
57. Petersen, W. and T. Zantop, [Arthroscopic meniscal suture]. *Oper Orthop Traumatol*, 2006. 18(5-6): p. 393-410.
58. Albrecht-Olsen, P., G. Kristensen, and P. Tormala, Meniscus bucket-handle fixation with an absorbable Biofix tack: development of a new technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1993. 1(2): p. 104-6.
59. Koukoubis, T.D., et al., Meniscal fixation with an absorbable staple. An experimental study in dogs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1997. 5(1): p. 22-30.
60. Rispoli, D.M. and M.D. Miller, Options in meniscal repair. *Clin Sports Med*, 1999.

- 18(1): p. 77-91, vi.
61. Barber, F.A. and M.A. Herbert, Meniscal repair devices. *Arthroscopy*, 2000. 16(6): p. 613-8.
62. Barber, F.A. and J.E. McGarry, Meniscal repair techniques. *Sports Med Arthrosc*, 2007. 15(4): p. 199-207.
63. Bellemans, J., et al., Fixation strength of meniscal repair devices. *Knee*, 2002. 9(1): p. 11-4.
64. Boenisch, U.W., et al., Pull-out strength and stiffness of meniscal repair using absorbable arrows or Ti-Cron vertical and horizontal loop sutures. *Am J Sports Med*, 1999. 27(5): p. 626-31.
65. Dervin, G.F., et al., Failure strengths of suture versus biodegradable arrow for meniscal repair: an in vitro study. *Arthroscopy*, 1997. 13(3): p. 296-300.
66. Durselen, L., et al., Gapping phenomenon of longitudinal meniscal tears. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2003. 18(6): p. 505-10.
67. Bohnsack, M. and O. Ruhmann, [Arthroscopic meniscal repair with bioresorbable implants]. *Oper Orthop Traumatol*, 2006. 18(5-6): p. 425-52.
68. Tielinen, L., et al., Clinical and MRI evaluation of meniscal tears repaired with bioabsorbable arrows. *Scand J Surg*, 2007. 96(3): p. 252-5.
69. Gifstad, T., T. Grontvedt, and J.O. Drogset, Meniscal repair with biofix arrows: results after 4.7 years' follow-up. *Am J Sports Med*, 2007. 35(1): p. 71-4.
70. Ishimura, M., S. Tamai, and Y. Fujisawa, Arthroscopic meniscal repair with fibrin glue. *Arthroscopy*, 1991. 7(2): p. 177-81.
71. Ishimura, M., et al., Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part I: Experimental study. *Arthroscopy*, 1997. 13(5): p. 551-7.
72. Scotti, C., et al., Healing of meniscal tissue by cellular fibrin glue: an in vivo study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2009. 17(6): p. 645-51.
73. Sitterle, V.B., J.F. Nishimuta, and M.E. Levenston, Photochemical approaches for bonding of cartilage tissues. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(12): p. 1649-56.
74. Johnson, L.L. and J.A. Feagin, Jr., Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study. *Arthroscopy*, 2000. 16(2): p. 191-6.
75. Kohn, D., et al., Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. An experimental study in sheep. *Int Orthop*, 1997. 21(4): p. 232-8.
76. Milachowski, K.A., D. Kohn, and C.J. Wirth, [Meniscus replacement using Hoffa's infrapatellar fat bodies--initial clinical results]. *Unfallchirurgie*, 1990. 16(4): p. 190-5.
77. Milachowski, K.A., K. Weismeier, and C.J. Wirth, Homologous meniscus transplantation. Experimental and clinical results. *Int Orthop*, 1989. 13(1): p. 1-11.
78. Stone, K.R., et al., Autogenous replacement of the meniscus cartilage: analysis of results and mechanisms of failure. *Arthroscopy*, 1995. 11(4): p. 395-400.
79. Canham, W. and W. Stanish, A study of the biological behavior of the meniscus as a transplant in the medial compartment of a dog's knee. *Am J Sports Med*, 1986. 14(5): p. 376-9.
80. Hommen, J.P., G.R. Applegate, and W. Del Pizzo, Meniscus allograft transplantation: ten-year results of cryopreserved allografts. *Arthroscopy*, 2007. 23(4): p. 388-93.
81. Packer, J.D. and S.A. Rodeo, Meniscal allograft transplantation. *Clin Sports Med*, 2009. 28(2): p. 259-83, viii.
82. Rijk, P.C., Meniscal allograft transplantation--part I: background, results, graft

- selection and preservation, and surgical considerations. *Arthroscopy*, 2004. 20(7): p. 728-43.
83. Rijk, P.C., Meniscal allograft transplantation--part II: alternative treatments, effects on articular cartilage, and future directions. *Arthroscopy*, 2004. 20(8): p. 851-9.
84. Rodeo, S.A., et al., Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, 2000. 82-A(8): p. 1071-82.
85. Stone, K.R., Meniscus replacement. *Clin Sports Med*, 1996. 15(3): p. 557-71.
86. Stone, K.R., et al., Meniscal sizing based on gender, height, and weight. *Arthroscopy*, 2007. 23(5): p. 503-8.
87. Wirth, C.J., et al., Long-term results of meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med*, 2002. 30(2): p. 174-81.
88. Noyes, F.R. and S.D. Barber-Westin, Meniscus transplantation: indications, techniques, clinical outcomes. *Instr Course Lect*, 2005. 54: p. 341-53.
89. Verdonk, P.C., J.H. Lubowitz, and K.F. Almqvist, Langzeitergebnisse nach Meniskustransplantation. *Arthroskopie*, 2008. 21: p. 259-265.
90. Noyes, F.R. and S.D. Barber-Westin, Irradiated meniscus allografts in the human knee: a two to five year follow-up study. *Orthop Trans*, 1995. 19: p. 417.
91. Sekiya, J.K., et al., Clinical outcomes following isolated lateral meniscal allograft transplantation. *Arthroscopy*, 2006. 22(7): p. 771-80.
92. Rodeo, S.A., Meniscal allografts--where do we stand? *Am J Sports Med*, 2001. 29(2): p. 246-61.
93. Verdonk, P.C., et al., Transplantation of viable meniscal allograft. Survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. 87(4): p. 715-24.
94. Arnoczky, S.P., R.F. Warren, and J.M. Spivak, Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 1988. 70(8): p. 1209-17.
95. Port, J., et al., Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model. *Am J Sports Med*, 1996. 24(4): p. 547-55.
96. Sommerlath, K. and J. Gillquist, The effect of a meniscal prosthesis on knee biomechanics and cartilage. An experimental study in rabbits. *Am J Sports Med*, 1992. 20(1): p. 73-81.
97. Toyonaga, T., N. Uezaki, and H. Chikama, Substitute meniscus of Teflon-net for the knee joint of dogs. *Clin Orthop Relat Res*, 1983(179): p. 291-7.
98. Wood, D.J., R.J. Minns, and A. Strover, Replacement of the rabbit medial meniscus with a polyester-carbon fibre bioprosthesis. *Biomaterials*, 1990. 11(1): p. 13-6.
99. de Groot, J.H., et al., Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses. *Biomaterials*, 1996. 17(2): p. 163-73.
100. Martinek, V. and A.B. Imhoff, Das künstliche Meniskusimplantat. *Arthroskopie*, 2008. 21(4): p. 266-70.
101. Verdonk, R., et al., Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions. *Am J Sports Med*, 2011. 39(4): p. 774-82.
102. Stone, K.R., et al., Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. *Am J*

- Sports Med, 1992. 20(2): p. 104-11.
103. van Wachem, P.B., et al., In vivo degradation of processed dermal sheep collagen evaluated with transmission electron microscopy. *Biomaterials*, 1991. 12(2): p. 215-23.
104. Rodkey, W.G., et al., Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2008. 90(7): p. 1413-26.
105. Angele, P., et al., Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 2004. 25(14): p. 2831-41.
106. Angele, P., et al., [Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*, 1998. 115(Suppl I): p. 205-8.
107. Angele, P., et al., Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology*, 2004. 41(3-4): p. 335-46.
108. Angele, P., et al., Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res*, 2003. 21(3): p. 451-7.
109. Angele, P., et al., Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng*, 1999. 5(6): p. 545-54.
110. Koide, M., et al., A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res*, 1993. 27(1): p. 79-87.
111. Abatangelo, G., et al., Cell detachment mediated by hyaluronic acid. *Exp Cell Res*, 1982. 137(1): p. 73-8.
112. Cortivo, R., et al., Hyaluronic acid promotes chick embryo fibroblast and chondroblast expression. *Cell Biol Int Rep*, 1990. 14(2): p. 111-22.
113. Mast, B.A., et al., Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix*, 1993. 13(6): p. 441-6.
114. Radice, M., et al., Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res*, 2000. 50(2): p. 101-9.
115. Rooney, P. and S. Kumar, Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis. *Differentiation*, 1993. 54(1): p. 1-9.
116. Wheatley, S.C., C.M. Isacke, and P.H. Crossley, Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development*, 1993. 119(2): p. 295-306.
117. Angele, P., et al., Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A*, 2008. 85(2): p. 445-55.
118. Zellner, J., et al., Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 94(4): p. 1150-61.
119. Schumann, D., Methoden zur Optimierung von Tissue Engineering Produkten auf dem Wege zur Reparatur osteochondraler Defekte. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der naturwissenschaftlichen Fakultät IV der Universität Regensburg. 2004.
120. Wahlberg, E., Angiogenesis and Arteriogenesis - the Basics. *VascularWeb*. Online

- Besuch vom 21.10.08.
http://www.vascularweb.org/professionals/Research/Basic_Articles/Angiogenesis_Wahlberg.html.
121. Petersen, W., et al., Locally applied angiogenic factors--a new therapeutic tool for meniscal repair. *Ann Anat*, 2005. 187(5-6): p. 509-19.
 122. Pufe, T., et al., Endostatin/collagen XVIII--an inhibitor of angiogenesis--is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biol*, 2004. 23(5): p. 267-76.
 123. Endrich, B., et al., Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*, 1980. 177(2): p. 125-34.
 124. Papenfuss, H.D., et al., A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res*, 1979. 18(3): p. 311-8.
 125. Asaishi, K., et al., Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res*, 1981. 41(5): p. 1898-904.
 126. Carmeliet, P. and R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 249-57.
 127. Guba, M., et al., A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*, 2001. 61(14): p. 5575-9.
 128. O'Reilly, M.S., et al., Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997. 88(2): p. 277-85.
 129. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006. 98(5): p. 1076-84.
 130. Tang, Y.L., et al., Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment. *Regul Pept*, 2005. 125(1-3): p. 1-8.
 131. Tang, Y.L., et al., Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*, 2004. 117(1): p. 3-10.
 132. Murphy, J.M., et al., Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(12): p. 3464-74.
 133. Hoberg, M., et al., Induction of endostatin expression in meniscal fibrochondrocytes by co-culture with endothelial cells. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2009. 129(8): p. 1137-43.
 134. Becker, R., et al., Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*, 2004. 86(7): p. 1082-7.
 135. Hofstaetter, J.G., et al., Differential expression of VEGF isoforms and receptors in knee joint menisci under systemic hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 324(2): p. 667-72.
 136. Kopf, S., et al., Local treatment of meniscal lesions with vascular endothelial growth factor. *J Bone Joint Surg Am*, 2010. 92(16): p. 2682-91.

6 Anhang

6.1 Lebenslauf

Siehe Printversion.

6.2 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Peter Angele danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen, sowie für das stetige Interesse.

Herrn Prof. Dr. Michael Nerlich danke ich für die interessanten Denkanstöße und die konstruktive Kritik beim Anfertigen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans J. Schlitt und Herrn Prof. Edward K. Geissler danke ich für die fruchtbare Kooperation und der Möglichkeit zur Durchführung der in vivo Experimente in den Laboratorien der chirurgischen Klinik.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Johannes Zellner und Frau Dr. Gudrun Köhl für die großartige Betreuung in allen Fragen dieser Arbeit. Ihre freundschaftliche Unterstützung und ihr unermüdliches Engagement waren stets motivierend. Durch ihre Ideen, Vorschläge und Erklärungen wurde dieses Projekt erst möglich.

Herrn Dr. Richard Kujat für die Bereitstellung der Matrix und seinem großen Einsatz beim Peroxidase-Nachweis.

Frau Daniela Drenkard für ihre zahlreichen konstruktiven Lösungsvorschläge bei kleinen und großen Problemen des Laboralltags.

Herrn Robert Aigner für die unkomplizierte Überlassung „neurologischen“ Arbeitsmaterials.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Zentrums für Medizinische Biotechnologie und den Mitarbeitern der Chirurgie H4 für die freundliche Aufnahme in beide Teams und die vielen, gemeinsam verbrachten Stunden.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt und auch während des Studiums auf dem Weg zur Promotion bestärkt haben.

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

Tobias Ehrenreich