

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

ZYTOTOXIZITÄT VON LOKALANÄSTHETIKA AUF
HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN WÄHREND DER CHONDROGENESE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ingrid Scheidhammer

2017

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

ZYTOTOXIZITÄT VON LOKALANÄSTHETIKA AUF
HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN WÄHREND DER CHONDROGENESE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ingrid Scheidhammer

2017

1. Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Angele

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2017

**Gewidmet
meiner Familie und Thomas
in Liebe und Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knorpelschäden – Eine Herausforderung für die orthopädische Chirurgie	1
1.2	Tissue Engineering: Autologe Chondrozytentransplantation	4
1.3	Mesenchymale Stammzellen	6
1.4	Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf Chondrozyten und MSCs	8
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	9
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Geräte und Hilfsmittel	11
2.1.2	Verbrauchsmaterial	12
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen	15
2.1.5	Biologisches Untersuchungsmaterial.....	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Von der Knochenmarkspunktion zum Aggregat.....	17
2.2.2	Behandlung der Aggregate mit Lokalanästhetika.....	20
2.2.3	Makroskopie	22
2.2.4	Histologische und immunologische Färbungen.....	22
2.2.5	Biochemische Analysen	25
2.2.6	Statistik.....	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Makroskopie	29
3.2	DMMB-Färbung.....	31
3.3	Kollagen-I und Kollagen-II in der Immunhistologie	33
3.4	Live-Dead-Staining	36

3.5 Caspase-Aktivität.....	42
3.6 Kollagen-II-Gehalt und DNA-Gehalt im ELISA.....	45
4 Diskussion	47
4.1 Zusammenhang zwischen mesenchymalen Stammzellen, Lokalanästhetika und Tissue Engineering	47
4.2 Spezielle methodische Aspekte	48
4.3 Abhängigkeit der Zytotoxizität der Lokalanästhetika von Volumen und Struktur der extrazellulären Matrix.....	50
4.4 Einfluss von Lokalanästhetika auf das Chondrogenesepotential mesenchymaler Stammzellen	53
4.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	54
4.6 Ausblick.....	56
5 Zusammenfassung.....	58
6 Anhang	60
6.1 Abkürzungsverzeichnis	60
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	61
6.3 Literaturverzeichnis.....	64
6.4 Veröffentlichung	79
6.5 Erklärung zur Dissertation	79
6.6 Danksagung.....	81

1 Einleitung

Gelenkknorpelläsionen gehören zu den häufigsten Erkrankungen in den westlichen Ländern. Etwa 10 - 12 % der Bevölkerung leiden unter Knorpelschäden [1]. Die Arthrose, die sich durch einen Verlust von Gelenkknorpel auszeichnet und zu chronischen Schmerzen sowie Verlust der Gelenkfunktion führt, betrifft 9,6 % der Männer und 18 % der Frauen über 60 Jahre [2]. Jährlich werden in Deutschland ca. 145.000 Knieendoprothesen implantiert [3]. Laut Krankheitskostenrechnung des Statistischen Bundesamtes beliefen sich die Ausgaben für die Behandlung der Arthrose im Jahr 2008 auf 7,6 Milliarden Euro [4]. Hinzu kommen die Kosten für die dadurch bedingten Arbeitsausfälle. In den USA ist die Arthrose nach der koronaren Herzkrankheit der zweithäufigste Grund für Arbeitsunfähigkeit bei Männern über 50 Jahren [5]. Angesichts des demographischen Wandels mit einer zunehmend alternden Gesellschaft sowie einer steigenden Prävalenz von Adipositas werden Erkrankungen des Gelenkknorpels in den nächsten Jahren weiter an Bedeutung gewinnen [6,7]. Somit sind Knorpelschäden sowohl aus medizinischer als auch aus sozioökonomischer Sicht von grundlegendem Interesse. Deshalb muss es in den kommenden Jahren ein zentrales Ziel der medizinischen Forschung sein, effektive Therapiemöglichkeiten für diese Krankheitsgruppe zu finden und weiterzuentwickeln.

1.1 Knorpelschäden – Eine Herausforderung für die orthopädische Chirurgie

Knorpelschäden stellen eine große Herausforderung für die orthopädische Chirurgie dar, was vor allem an der begrenzten intrinsischen Regenerationsfähigkeit von hyalinem Knorpelgewebe liegt. Hunter stellte schon im 18. Jahrhundert die These auf, dass verletzter Knorpel sich nicht selbst reparieren kann [8]. Als möglicher Grund dafür wird die fehlende vaskuläre, lymphatische und nervale Versorgung von adultem Knorpelgewebe gesehen [9]. Chondrozyten zeichnen sich durch eine geringe Teilungsfähigkeit aus und sind in der extrazellulären Matrix eingeschlossen, was den Knorpel zu einem bradytrophen Gewebe

macht [10]. Die fehlende intrinsische Regenerationsfähigkeit des hyalinen Knorpels führt dazu, dass unbehandelte Defekte oft in eine sekundäre Arthrose übergehen [11].

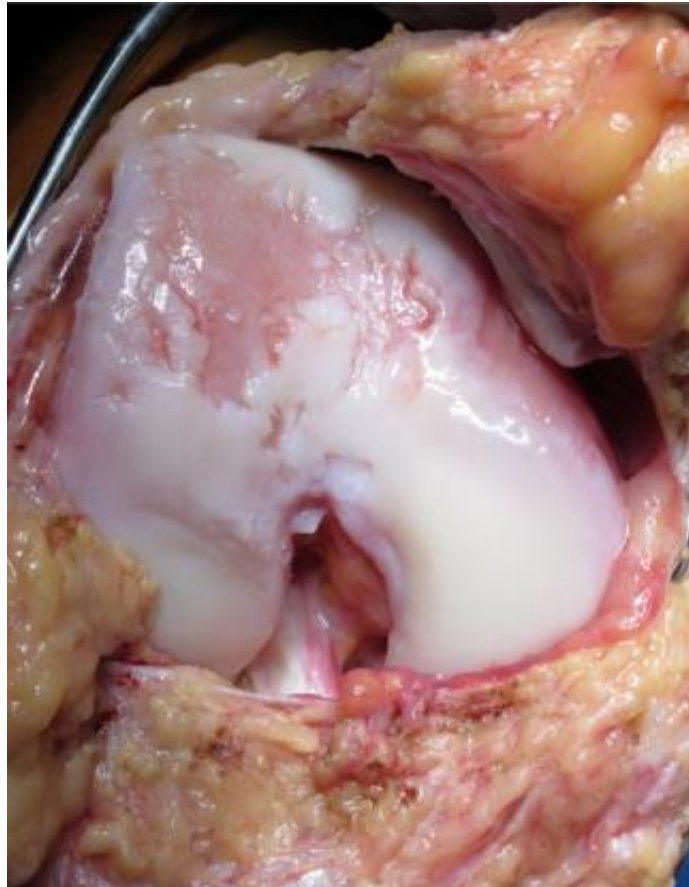


Abbildung 1-1: Intraoperatives Bild eines rechten Knies mit einem großen Knorpelschaden der seitlichen und zentralen Trochlea. Quelle: Gomoll, 2014 [12]

Die momentan verfügbaren Behandlungsmethoden für Gelenkknorpelläsionen umfassen ein breites Spektrum von konservativen Maßnahmen über minimal-invasive Methoden bis hin zum Gelenkersatz mittels Prothese.

Als konservative Möglichkeiten stehen unter anderem orale Analgetika, Gewichtsreduktion und Physiotherapie zur Verfügung. Diese können in manchen Fällen einen chirurgischen Eingriff verhindern oder zumindest hinauszögern, allerdings dienen sie nur der Symptomlinderung, nicht aber der Heilung des Knorpeldefekts [13].

Am anderen Ende der Therapiemöglichkeiten steht der endoprothetische Gelenkersatz, welcher bevorzugt bei älteren Menschen mit fortgeschrittener destruierender Arthrose zum Einsatz kommt [14]. Hiermit kann schnell eine Verbesserung der Gelenkfunktion sowie Schmerzlinderung erzielt werden. Dem gegenüber steht allerdings eine Reihe von Nachteilen: Eine Prothese kann die natürliche Anatomie eines Gelenks lediglich nachahmen, sodass es zu Funktionseinschränkungen kommen kann. Im Laufe der Jahre kommt es zum Verschleiß der Prothese, was eine erneute Operation mit Austausch der Prothese unvermeidbar macht [15].

So ist es vor allem bei jüngeren Patienten von Bedeutung, Knorpelschäden frühzeitig zu behandeln, bevor es zur Ausbildung einer Arthrose kommt. Dazu steht eine Reihe von minimal-invasiven Methoden zur Verfügung.

Bei markraumeröffnenden Verfahren wie der Mikrofrakturmethode [16] oder der Bohrung nach Pridie [17] wird im Rahmen einer Arthroskopie die subchondrale Platte verletzt, sodass es zu einer Einblutung aus dem Knochenmark in den defekten Knorpel kommt. Im Blutgerinnsel befinden sich mesenchymale Stammzellen, die zur Ausbildung von faserknorpeligem Reparaturgewebe führen. Diese kostengünstigen Methoden mit geringem Materialaufwand gelten bei kleinen Defekten bis 3 cm² als Verfahren erster Wahl [18]. Der gebildete Faserknorpel ist dem hyalinen Gelenkknorpel allerdings in seinen biomechanischen Eigenschaften deutlich unterlegen, was trotz initial guter Ergebnisse nach einigen Jahren zu einem schlechteren Outcome führt und so die Entwicklung einer sekundären Arthrose begünstigt [19,20].

Bei der osteochondralen autologen Transplantation (sog. Mosaikplastik) werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus einem weniger belasteten Teil des Gelenks entnommen und an die Stelle des Defekts transplantiert [21]. Da nur eine begrenzte Anzahl an Zylindern entnommen werden kann, eignet sich diese Methode ebenfalls nur für kleinere Defekte bis 4 cm². Ein weiterer Nachteil ist der iatrogen verursachte Defekt an der Entnahmestelle. Bei der allogenen Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern kann dieses Problem zwar umgangen werden, jedoch kann es hierbei zur Übertragung von Infektionskrankheiten kommen [12]. Eine weitere Komplikation der osteochondralen Transplantation ist die mangelnde Integration des Zylinders in das umliegende Gewebe [22].

1.2 Tissue Engineering: Autologe Chondrozytentransplantation

Eine ideale Behandlung von Knorpelläsionen sollte also folgende Voraussetzungen erfüllen: Die Methode soll auch für größere Defekte geeignet sein. Das Reparaturgewebe sollte sich gut in das umliegende Gewebe integrieren lassen. Es sollte dem ursprünglichen hyalinen Knorpel möglichst nahe kommen und den alltäglichen Belastungen gewachsen sein, damit das Fortschreiten der Knorpelläsion zu einer Arthrose möglichst vermieden werden kann [13].

Eine aussichtsreiche Methode, die all diese Voraussetzungen zu erfüllen verspricht, ist die autologe Chondrozytentransplantation, die als eines der ersten Tissue-Engineering-Verfahren gilt.

Das Prinzip des Tissue Engineerings kam in den 1980er Jahren auf mit dem Ziel der Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktion [23]. Die drei entscheidenden Komponenten des Tissue Engineering sind Zellen, Wachstumsfaktoren und ein Trägermaterial, auf dem die Zellen aufgetragen werden, das sogenannte Scaffold [24].

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) wurde 1994 von Brittberg und Peterson eingeführt [25] und bedient sich der Prinzipien des Tissue Engineerings: Dabei werden autologe Chondrozyten mittels Knorpelbiopsie von einer wenig beanspruchten Stelle des Gelenks entnommen, *in vitro* in einem Nährmedium mit Wachstumsfaktoren vermehrt und anschließend an den Ort des Knorpelschadens eingebracht. Bei der Originaltechnik wird die Zellsuspension mit einem Periostlappen abgedeckt, bei der ACT der zweiten Generation dient eine Kollagenmembran zur Abdeckung [26]. Die Verfahren der dritten Generation, die sogenannten Matrix-assoziierten Transplantationsverfahren, arbeiten mit diversen zellbesiedelten Bio- bzw. Trägermaterialien [27].

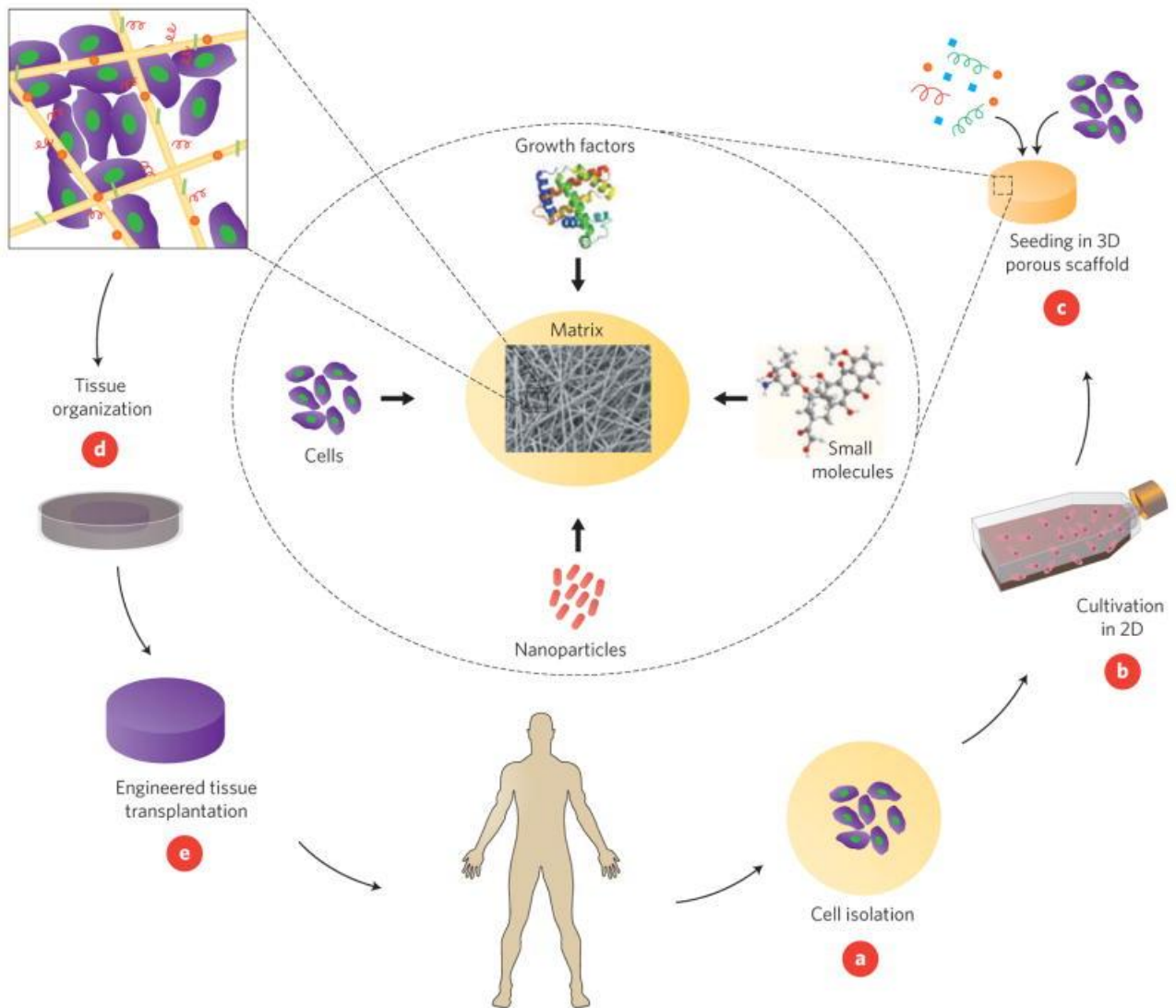


Abbildung 1-2: Prinzip des Tissue Engineering: Körpereigene Zellen werden isoliert, mit Hilfe von Wachstumsfaktoren kultiviert und auf ein Gerüst, das sog. Scaffold, aufgebracht. Das fertige Produkt wird dem Patienten anschließend transplantiert. Quelle: Dvir 2011 [28].

Der Regeneratknorpel bei der ACT weist eine hyalinartige Struktur auf und scheint somit dem faserknorpeligen Regeneratgewebe bei der Mikrofrakturierung überlegen zu sein [29,30]. Die ACT zeigt bei größeren Defekten signifikant bessere Langzeitergebnisse [31–34]. Laut den Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU ist die ACT bei einer Defektgröße ab 3-4 cm² daher die Methode erster Wahl, bei sportlich aktiven und jüngeren Patienten sogar schon ab 2,5 cm² [18].

Trotz ihrer Erfolge sollten auch die Nachteile der ACT nicht außer Acht gelassen werden: Durch die Entnahme der Chondrozyten mittels Knorpelbiopsie entsteht ein zweiter, iatrogen

Defekt im gesunden Knorpelgewebe, wodurch ein erhöhtes Risiko für Infektionen, entzündliche Veränderungen und zusätzliche Schmerzen besteht [35]. Neben dem Nachteil erhöhter Therapiekosten stellt das zweizeitige Vorgehen bei der ACT eine zusätzliche Belastung für den Patienten dar. Des Weiteren ist das Vermehrungspotential von Chondrozyten eingeschränkt, durch Dedifferenzierung kommt es zu Veränderungen des Phänotyps der Chondrozyten [36–38].

1.3 Mesenchymale Stammzellen

Angesichts der Limitationen der Chondrozytentransplantation stellt der Einsatz mesenchymaler Stammzellen (MSC) zur Knorpelregeneration eine vielversprechende Alternative dar.

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Progenitorzellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie durch ihre extensive Proliferationsfähigkeit aus und sind in der Lage, zu verschiedensten Geweben zu differenzieren, u.a. zu Knochen-, Muskel- oder Knorpelgewebe [39]. Außerdem unterstützen sie Reparatur- und Regenerationsprozesse in verletzten Gewebe durch die Sekretion bestimmter bioaktiver Moleküle [40].

Seit den Arbeiten von Johnstone und Pittenger ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren *in vitro* zu Knorpelgewebe differenzieren können und so eine Möglichkeit zur zellulären Reparatur von Knorpelschäden darstellen [41–43].

Mesenchymale Stammzellen finden sich im Knochenmark [44], im Fettgewebe [45], in der Synovialmembran [46] sowie anderen Geweben und können von dort einfach gewonnen und vermehrt werden. Ein zweimaliger operativer Eingriff wie bei der autologen Chondrozytentransplantation mit den entsprechenden Komplikationen eines weiteren Defekts im Knorpelgewebe entfällt somit bei der Knorpelregeneration mit MSCs.

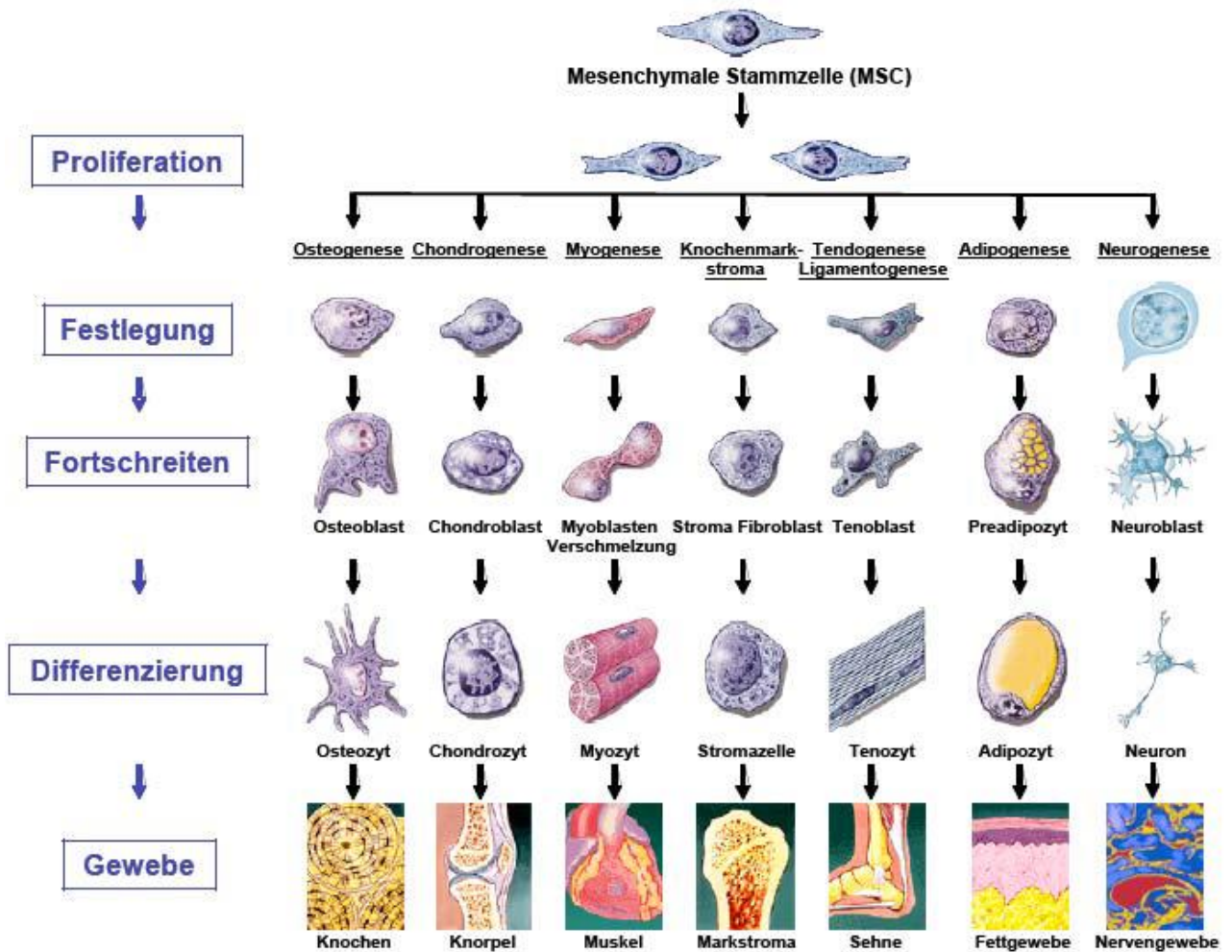


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Multipotenz bzw. Differenzierung mesenchymaler Stammzellen nach Caplan [39]

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen und zu induzierten pluripotenten Stammzellen, die ebenfalls potentielle Zellquellen für das Tissue Engineering darstellen, ergeben sich bei der Verwendung von mesenchymalen Stammzellen weder gravierende ethische Probleme noch die Gefahr einer malignen Entartung der eingepflanzten Zellen [47,48].

Aufgrund ihrer guten Vermehrungs- und Differenzierungseigenschaften und ihrer einfachen Verfügbarkeit bieten sich mesenchymale Stammzellen als Zellquelle für das Tissue Engineering im Bereich der Knorpelreparatur an. Sie zeigten gute Ergebnisse bei der Reparatur lokalisierter Knorpeldefekte und könnten in Zukunft weitere Therapieansätze für die Behandlung größerer Knorpelschäden bieten [35,38,47,49–52]. Ebenso kommen mesenchymale Stammzellen für die Reparatur von Meniskusschäden in Betracht [53].

1.4 Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf Chondrozyten und MSCs

Lokalanästhetika sind sowohl im perioperativen als auch im ambulanten Bereich weit verbreitet. Durch die Blockade spannungsabhängiger Natrium-Kanäle blockieren sie reversibel die Fortleitung von Aktionspotentialen [54]. Perioperative Schmerzen können mit Hilfe von Lokalanästhetika effektiv reduziert werden und so der Verbrauch von Narkotika gesenkt werden [55]. In der orthopädischen Chirurgie werden im Rahmen von arthroskopischen Eingriffen Lokalanästhetika als effiziente, kostengünstige und gut tolerierte Präparate vielfach verwendet [56,57].

Jedoch zeigten Studien in den letzten Jahren, dass einige der am häufigsten verwendeten Lokalanästhetika wie Bupivacain, Lidocain, Ropivacain und Mepivacain sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zytotoxische Effekte auf Chondrozyten haben [55,58–61]. Es wurde über Chondrolysen im Knie- und Glenohumeralgelenk nach der intraartikulären Infusion von Lokalanästhetika berichtet [62,63]. Chu et al. belasteten *in vitro* humane und bovine Chondrozyten mit 0,5 % Bupivacain, woraufhin sich langfristig mehr als 95 % Zellnekrosen ergaben [59]. Breu et al. zeigten, dass Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain dosis- und zeitabhängig eine toxische Wirkung auf Chondrozyten haben [64]. Osteoarthrotischer Knorpel zeigte sich dabei anfälliger für die toxische Wirkung der Lokalanästhetika als intakter Knorpel. Bupivacain scheint stärker toxisch zu wirken als Ropivacain und Mepivacain [55,64,65]. Der genaue Mechanismus der Zytotoxizität ist noch ungeklärt. Eine Theorie ist, dass Lokalanästhetika die mitochondriale DNA schädigen, was zu mitochondrialer Dysfunktion, Apoptose und Nekrose führt [66].

Doch nicht nur auf Chondrozyten, sondern auch auf mesenchymale Stammzellen haben Lokalanästhetika eine zytotoxische Wirkung [67–69]. Als Erste zeigten Lucchinetti et al., dass Ropivacain, Bupivacain und Lidocain die Proliferation und Differenzierung von MSCs aus dem Knochenmark der Maus vermindern [70]. In einer Studie von Rahnama et al. hatten Ropivacain und Bupivacain eine limitierte Toxizität auf humane MSCs, während Lidocain die Vitalität von humanen MSCs signifikant verminderte [69]. Dregalla et al. fanden heraus, dass eine Behandlung mit Lokalanästhetika für 24 Stunden einen signifikanten Einfluss sowohl auf die Vitalität als auch auf die Adhäsion von MSCs hatte. Außerdem kam es nach Behandlung bei allen verwendeten Lokalanästhetika außer Ropivacain auch schon nach kurzer Exposition

zum Zelltod mittels Apoptose [70]. Über die genauen Mechanismen bei der Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf MSCs ist wenig bekannt. Gray et al. vermuteten, dass Lokalanästhetika einen Einfluss auf die Sekretion von TNF- α durch Makrophagen und die Produktion von Prostaglandin E2 durch MSCs haben, was die Funktion von MSCs sekundär vermindern kann [71].

In einer Studie von Breu et al. [67] hatten Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain konzentrations- und zeitabhängig zytotoxische Effekte auf MSCs in Monolayer-Kulturen. Die niedrigsten Vitalitätsraten wurden 96 Stunden nach einer einstündigen Belastung gefunden. Unmittelbarer Zelltod wurde vor allem durch Nekrosen verursacht, gefolgt von Apoptosen. Allerdings zeigte sich, dass MSCs, die nach der Chondrogenese im dreidimensionalen Aggregatmodell in Knorpelgewebe eingebettet waren, keinen Schaden von der Behandlung mit Lokalanästhetika davontrugen.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

MSC-basierte Knorpelreparatur erscheint als eine vielversprechende Therapieoption bei Knorpeldefekten und die intraartikuläre Applikation von Lokalanästhetika ist eine effektive Methode zur Schmerzkontrolle. Daher ist die Frage, ob Lokalanästhetika im Rahmen von MSC-basierten Tissue-Engineering-Verfahren angewendet werden können, von großer klinischer Relevanz.

Es wurde bereits gezeigt, dass Lokalanästhetika zytotoxische Effekte auf Chondrozyten und auch auf mesenchymale Stammzellen haben. Dabei war die toxische Wirkung bei arthrotischem Knorpel stärker als bei intaktem Knorpel [64]. Außerdem wirkten Lokalanästhetika schädlich auf MSCs in Monolayer-Kultur, hatten aber keinen Einfluss auf MSCs nach vollzogener Chondrogenese [67]. Daraus ergibt sich, dass die extrazelluläre Matrix die Zytotoxizität von Lokalanästhetika beeinflussen kann. Ob Lokalanästhetika auch negative Effekte auf die Chondrogenese von MSCs haben, ist bisher nicht erforscht.

Die Chondrogenese vollzieht sich in gut erforschten Schritten. Definierte Kultursysteme liefern Knorpelgewebe mit Extrazellulärmatrix von variierender Quantität und Qualität, je nach der

Dauer der Kultur unter chondrogenen Bedingungen [41,72,73]. Diese Aggregate, die aus MSCs und umgebender Extrazellulärmatrix von unterschiedlicher Beschaffenheit bestehen, können benutzt werden, um den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Zytotoxizität von Lokalanästhetika zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie sich eine Kurzzeitbehandlung mit Bupivacain, Mepivacain oder Ropivacain auf die Vitalität von humanen mesenchymalen Stammzellen auswirkt, die von Extrazellulärmatrix mit variierendem Volumen und Struktur umgeben sind. Außerdem sollen mögliche Effekte von Lokalanästhetika auf das Chondrogenesepotential mesenchymaler Stammzellen untersucht werden.

Es sollen folgenden Hypothesen überprüft werden:

Hypothese 1: Die Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen ist vom Volumen und der Struktur der extrazellulären Matrix der Aggregate abhängig.

Hypothese 2: Die Behandlung mit Lokalanästhetika beeinflusst das Chondrogenesepotential mesenchymaler Stammzellen nachteilig.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Autoklavierer	Melatronc 23	Melag, Berlin
Brutschrank	HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Digitalfotokamera	Polaroid DMC 3	Polaroid, Dreieich
Homogenisator	Homogenisator 40/E	Xenox, Niersbach
Kryotom	Kryostat Microm HM 500 OM	Microm, Berlin
Mikroskope	Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
	Fluovort FU	Leitz, Wetzlar
	Nicon Eclipse TE2000U	Nicon GmbH, Düsseldorf
Mikroskopkamera	DMC 2	Polaroid, Offenbach
Multipette	Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Messgerät	Labor-pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer	Ultrospect 2000	Pharmacia Biotech
Pipettierhilfe	Falcon Express	Falcon, Heidelberg
Reinraumwerkbank	M18 (Laminar Flow)	Schulz Lufttechnik GmbH
Rotator	Rotator	Kisker Biosafe, Steinfurt
Schüttler	Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Sicherheitswerkbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	Vacubrand RZ5	Vacubrand, Wertheim
Waagen	PM2000	Mettler, Gießen
Wasserbad	Wasserbad GFL 1003	GFL, Burgwedel
Zellzählung	Neubauer-Zählkammer	Brand, Gießen
Zentrifugen	Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge / Vortex	Kisker, Steinfurt

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Deckgläser 24 × 24mm, 24 × 32mm	Roth, Karlsruhe
Filter	Sterifilter	Falcon, Heidelberg
Gefäße	Eppendorf-Cups	Sarstedt, Newton, NC
	Falkon 15 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	Falkon 50 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	Polypropylenzentrifugenröhrchen	NeoLab, Heidelberg
	24-Well-Platten	Falcon, Heidelberg
	96-Well-Platten	Falcon, Heidelberg
Objekträger	Zellkulturflaschen 75 cm ²	Eppendorf, Hamburg
	Star Frost	Knittel Gläser, Braunschweig
Parafilm	Parafilm M	Pechiney, Chicago, USA
Pipettiermaterial	Combitips plus 0,1/0,5/1/5/10 ml	Eppendorf, Hamburg
	Costar Stripette 1/5/10/25/60 ml	Corning, USA
	Pipettensets 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Pipettenspitzen epTips dual filter 10/100/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Serum-Röhrchen	S-Monovette 5,5ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

2.1.3.1 Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien

BSA	Roche Diagnostics, Mannheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chromalaun	Sigma, Taufkirchen

Cobaltchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EDTA 0,02%	Sigma Aldrich, Steinheim
Elastase	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ficoll	Sigma Aldrich, Steinheim
Gelatine (Schwein)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
Goat Serum	Dako, Hamburg
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
TE-Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin 0,05%	Gibco, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Sigma, Taufkirchen

2.1.3.2 Zellkultur

Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM Low Glucose (1,0 g/Liter)	Gibco, Karlsruhe
DMEM High Glucose (4,5 g/Liter)	Gibco, Karlsruhe

Fetal Calf Serum (FCS), nicht hitzeinaktiviert	PAN, Aidenbach
Hepes-Puffer	Gibco, Karlsruhe
ITS-3	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
TGF- β	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.3.3 Medikamente

Bupivacain	Sigma Aldrich, Steinheim
Mepivacain	Sigma Aldrich, Steinheim
Ropivacain	Fagron, Barsbüttel

2.1.3.4 Histologie

Fixierung	Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
	Saccharose	Roth, Karlsruhe
	Tissue Tec	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Fluoreszenzmessung	DePex	Serva, Heidelberg
	Calcein AM	Life Technologies, Darmstadt
	Cell Event™ Caspase 3/7 Detection Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Steinheim
	Ethidiumbromid-Homodimer 1	Life Technologies, Darmstadt
DMMB-Färbung	1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB)	Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.3.5 Antikörper

Anti-Collagen-TypI-Mouse-IgG	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Collagen-TypII-Mouse-IgG	Calbiochem, Darmstadt
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse-IgG	Jackson, West Grove, PA, USA

2.1.3.6 Kits

ABC-Kit	Vector, Burlingame, CA, USA
Native Type II Collagen Detection Kit	Chondrex, Redmond, WA, USA
Quant iT Pico Green dsDNA Reagent and Kits	Invitrogen, Eugene, OR, USA

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Zellkultur

MSC-Kulturmedium: DMEM Low Glucose mit 10 % FCS nicht hitzeinaktiviert, 1% Hepes Puffer, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung

Chondrogenes Differenzierungsmedium: DMEM High Glucose mit 1mM Natrium-Pyruvat, 1% 100x ITS-3, 10 ng/ml TGF β -1, 100nM Dexamethason, 200 μ M Ascorbinsäure-2-Phosphat

2.1.4.2 Histologie

Fixierlösung (Standardfixans): 4% Formaldehyd in Phosphatpuffer 0,1M

Gelatinelösung für Objektträger: 0,5g Chromalaun in Aqua destillatum lösen, Gelatine in 45 ml Aqua destillatum einige Minuten quellen lassen, anschließend erhitzen bis zur Auflösung der Gelatine, erkalten lassen, Zugabe von Chromalaunlösung und 125 μ l Glutardialdehyd

2.1.4.3 Immunhistologie

Waschpuffer: 780ml Trispuffer 0,2M, 2220ml Aqua destillatum, 24,96g NaCl, 1200µl Triton 4%

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

Blockingpuffer: 60ml Aqua destillatum, 120ml Tris 0,2M (0,08M), 2400mg NaCl (0,8%), 30 ml Ziegenserum (10%), 30ml FCS (10%)

DAB-Arbeitslösung: 500µl DAB-Stammlösung (250µl 1% Diaminobenzidin, 250µl 0,2% BSA), 4500µl 0,1M mPBS, 120µl Ni/Co-Stammlösung, 3µl 6% H₂O₂ (direkt vor Verwendung)

Nickel-Kobalt-Stammlösung für DAB-Arbeitslösung: 100mg NiCl₂, 5mg CoCl₂, 10mg BSA, 10ml H₂O

2.1.4.4 ELISA

TBS-Puffer (10x): 1,0M Tris-Puffer, 2,0M NaCl, 50 mM CaCl₂, pH mit NaOH auf 7,8 - 8,0 einstellen

2.1.5 Biologisches Untersuchungsmaterial

Zur Gewinnung mesenchymaler Progenitorzellen wurden Knochenmarksproben von vier männlichen Patienten (Alter 19 bis 29 Jahre) mittels Beckenkammpunktion entnommen. Die Punktion erfolgte im Rahmen einer autologen Knochentransplantation.

Die Patienten waren vorher über die experimentelle Verwendung der Proben aufgeklärt worden und hatten eine Einverständniserklärung abgegeben. Die Daten der Patienten wurden anonymisiert und mittels Labornummern kategorisiert.

Die zuständige Ethikkommission hatte eine Genehmigung für diese Studie erteilt.

2.2 Methoden

2.2.1 Von der Knochenmarkspunktion zum Aggregat

Die Gewinnung und chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen erfolgte in einem dreidimensionalen Differenzierungsmodell gemäß Johnstone, dem sogenannten Pellet- oder Aggregat-Modell [41].

2.2.1.1 Stammzellgewinnung

Die frisch entnommenen Knochenmarksaspirate wurden im Verhältnis 1:5 mit MSC-Kulturmedium verdünnt. Je 15 ml des verdünnten Aspirats wurden in Zentrifugenröhrchen über einen Ficoll-Dichtegradienten [74] aufgetragen, um die MSCs aus den Proben zu separieren. Die Röhrchen wurden für 15 Minuten mit 1000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Während sich die Erythrozyten und Granulozyten am Boden der Röhrchen absetzten, sammelten sich die MSCs in der weißlichen Schicht mit mononukleären Zellen (1,073 g/ml). Diese Schicht wurde abpipettiert und in einem frischen Zentrifugenröhrchen mit MSC-Medium vermischt und für 5 Minuten mit 1000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in MSC-Kulturmedium resuspendiert und in einer Neubauerkammer ausgezählt. Je 15 ml Medium wurden in 75cm²-Kulturflaschen vorgelegt. Die Flaschen wurden mit je 10⁶ Zellen befüllt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Beim ersten Mediumwechsel wurden nicht adhärenente Zellen abgesaugt, um nur noch die adhärenenten Zellen (= mesenchymale Stammzellen) weiter zu kultivieren. Ein Mediumwechsel erfolgte 3-4 Mal pro Woche. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

2.2.1.2 Amplifizierung der MSCs

Zur Amplifizierung und Weiterverarbeitung wurden die bei – 80 °C tiefgefrorenen Zellen erst auf Eis gelagert und danach vorsichtig in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Es folgte die zügige Überführung in vorbereitete Falcons mit MSC-Kulturmedium. Die Falcons wurden bei 1000 Umdrehungen/min und 20 °C für vier Minuten zentrifugiert. Um eventuelle Überreste

des Einfriermediums zu entfernen, wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in MSC-Kulturmedium resuspendiert.

Es folgte die Auszählung der Zellen in einer Neubauerzählkammer: Dazu wurde ein Aliquot der Stammzelllösung in einem Eppendorfcup mit der gleichen Menge Trypanblau-Lösung vermischt. Die Anfärbung mit Trypanblau diente als Vitalitätstest, da nur die Zellmembran abgestorbener Zellen für den Farbstoff durchlässig ist. Die angefärbte Suspension wurde in die Zählkammer gefüllt. Nach ein bis zwei Minuten hatten sich die Zellen abgesetzt und konnten bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert und die einzelnen Quadranten ausgezählt werden. Der Prozentsatz der ungefärbten Zellen entsprach dabei dem Anteil vitaler Zellen.

Die Zelldichte, d.h. die Anzahl der Zellen pro Milliliter, errechnete sich dabei folgendermaßen:

$$\text{Zelldichte} = M \times \text{VF} \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

(M = Mittelwert der Zellzahl aus den vier Quadranten, VF = Verdünnungsfaktor)

Durch Multiplikation mit der zur Resuspension verwendeten Mediummenge konnte auf die Gesamtzellzahl geschlossen werden.

In Zellkulturflaschen (75 cm²) mit 15ml vorgelegtem MSC-Kulturmedium wurden schließlich zwischen 200.000 und 300.000 vitale Zellen ausgesät und anschließend im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zweimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel mit MSC-Kulturmedium. Nach einer Proliferationsdauer von zwei bis drei Wochen erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 %, sodass auf eine ca. 5-fache Amplifikation geschlossen werden konnte.

Es war wichtig, die MSCs vor Erreichen der vollständigen Konfluenz weiterzuverarbeiten, um eine Kontaktinhibierung in der vollständig besiedelten Zellkulturflasche zu vermeiden.

Um die MSCs vom Flaschenboden zu lösen, wurden sie trypsinisiert: Dazu wurde das MSC-Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit ca. 5 ml PBS gespült, um Serumreste vollständig zu entfernen. In jede Zellkulturflasche wurden anschließend 3 ml Trypsin-Lösung gegeben (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA) und für 2 – 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch vorsichtiges Schwenken wurde der gesamte Zellrasen mit Trypsin-Lösung bedeckt. Der

Flaschenboden wurde vorsichtig abgeklopft, sodass sich beinahe der gesamte Zellrasen ablöste, was mikroskopisch kontrolliert wurde. Nach der Ablösung wurde das Trypsin möglichst zügig durch Zugabe von MSC-Kulturmedium abgestoppt, um eine Zerstörung der Zellen zu verhindern.

2.2.1.3 Ansetzen der Aggregate

Die Zellsuspension mit den abtrypsinisierten MSCs wurde in 50ml-Falcons überführt und zehn Minuten lang mit 1000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand aus MSC-Kulturmedium wurde vorsichtig abgesaugt, die entstandenen Pellets aus den einzelnen Falcons wurden in DMEM-High-Glucose ohne Zusätze aufgenommen und in einem Falcon zusammengebracht. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugierung mit 1000 U/min bei Raumtemperatur wurde der Überstand wieder abgesaugt und das entstandene Pellet in DMEM-High-Glucose ohne Zusätze resuspendiert. Ein Aliquot wurde entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und die Zelldichte wurde mit Hilfe von Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es folgte eine erneute Zentrifugierung mit 1000U/min, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellzahl durch Zugabe von Chondrogenese-Kulturmedium, das die Chondrogenese induzierte, auf 200.000 Zellen pro 300 µl eingestellt. Von dieser Stammzellsuspension wurden je 300 µl pro Well mit Hilfe einer Multipette in 96-Well-Mikrotiterplatten verteilt. Die Platten wurden 5 Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert, sodass sich am Boden eines jeden Wells ein Pellet bildete. Diese Pellets aus MSCs durchliefen unter dem Einfluss des Chondrogenese-Kulturmediums eine 21-tägige chondrogene Differenzierung und stellten die im Nachfolgenden als Aggregate bezeichneten Untersuchungsobjekte dar. Die Mikrotiterplatten mit den Aggregaten wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mediumwechsel mit Chondrogenese-Kulturmedium erfolgte dreimal pro Woche.

2.2.2 Behandlung der Aggregate mit Lokalanästhetika

2.2.2.1 Vorbereiten der Lokalanästhetika

In dieser Studie sollten die Effekte der Pipecoloxylidid-Lokalanästhetika Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain untersucht werden.

Verschiedene Typen von Pipecoloxylidid-Lokalanästhetika unterscheiden sich in ihrem Wirkungsbeginn, der Dauer der Anästhesie und in ihrem analgetischen Potential. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und Lipophilität steigt das analgetische Potential von Mepivacain über Ropivacain zu Bupivacain in einem Verhältnis von 1:1,5:4 an. Wenn man ein Potenzverhältnis von 1:0,67:0,25 postuliert, ist Bupivacain 0,5% äquipotent zu Ropivacain 0,75% und zu Mepivacain 2%. Um diesen Umstand in der Studie zu berücksichtigen, wurden äquipotente Lösungen der drei Lokalanästhetika hergestellt.

50 ml NaCl wurden mit der entsprechenden Menge des reinen Lokalanästhetikums versetzt:

Bupivacain 0,5 % → 250 mg Bupivacain + 50 ml NaCl

Ropivacain 0,75 % → 375 mg Ropivacain + 50 ml NaCl

Mepivacain 2 % → 1 g Mepivacain + 50 ml NaCl

Das pulverartige, reine Lokalanästhetikum wurde dabei auf der Feinwaage abgewogen und anschließend durch vorsichtiges Vermischen mit der Pipette in NaCl aufgelöst. Die so entstandenen Lösungen wurden steril gefiltert und portioniert, bei – 20 °C eingefroren und jeweils direkt vor der Verwendung aufgetaut.

Alle Medikamente waren frei von Konservierungsmitteln. Um eventuelle Effekte des Natriumchlorids auf die Aggregate zu erkennen, wurden alle Versuche nicht nur mit den äquipotenten Lösungen der Lokalanästhetika durchgeführt, sondern auch mit reiner Natriumchlorid-Lösung.

2.2.2.2 Versuchsgruppe 1: Bestimmung der Zytotoxizität von Lokalanästhetika zu bestimmten Zeitpunkten der Chondrogenese

Im ersten Teil wurde die Zytotoxizität von Lokalanästhetika zu bestimmten Zeitpunkten der Chondrogenese untersucht. Die Aggregate wurden unter chondrogenen Bedingungen 7, 14 oder 21 Tage lang inkubiert. Anschließend wurde das Chondrogenese-Medium abgesaugt und die Aggregate wurden in 0,5% Bupivacain, 0,75% Ropivacain, 2% Mepivacain oder reiner Natriumchloridlösung eingelegt und für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch die Behandlung mit Natriumchlorid, in dem die Lokalanästhetika aufgelöst worden waren, sollten zytotoxische Effekte von Natriumchlorid auf die Aggregate ausgeschlossen werden. Anschließend wurden die Lösungen abgesaugt, die Aggregate wurden mit PBS gespült und für weitere 24 bzw. 96 Stunden in Chondrogenese-Medium kultiviert. Die Aggregate wurden schließlich entnommen und mit Live-Dead-Staining bzw. Caspase-Färbung qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Entnahme zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten diente dazu, den Zeitpunkt des größten Zellschadens zu ermitteln. Als Kontrollgruppe wurden Aggregate verwendet, die ohne Unterbrechung in Chondrogenese-Medium verblieben waren.

2.2.2.3 Versuchsgruppe 2: Bestimmung der Auswirkungen von Lokalanästhetika auf die Chondrogenese von MSCs

Im zweiten Teil sollten die längerfristigen Auswirkungen von Lokalanästhetika auf die Chondrogenese untersucht werden. Dazu wurden Aggregate unter chondrogenen Bedingungen 7 Tage lang inkubiert und an Tag 7 in Bupivacain (0,5%), Ropivacain (0,75%), Mepivacain (2%) oder Natriumchloridlösung eingelegt und für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Aggregate wurden anschließend mit PBS gewaschen und unter chondrogenen Bedingungen bis Tag 21 weiter kultiviert, sodass sich die chondrogene Differenzierung vollziehen konnte. Anschließend wurden die Aggregate entnommen und mittels histologischen und immunhistologischen Methoden sowie mittels ELISA qualitativ und quantitativ analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Aggregate verwendet, die ohne Unterbrechung in Chondrogenese-Medium verblieben waren.

2.2.3 Makroskopie

Aggregate jeder Zellreihe wurden an Tag 7, 14 und 21 entnommen. Sie wurden bei 1,5-facher Vergrößerung mikroskopiert und mit einer Digitalkamera fotografiert, um das Wachstum der Aggregate im Laufe der chondrogenen Differenzierung makroskopisch zu beurteilen.

2.2.4 Histologische und immunologische Färbungen

2.2.4.1 Fixierung

Die Aggregate wurden nach der Entnahme mit PBS gespült, für 1 Stunde in Standardfixierungslösung mit 4% Paraformaldehyd fixiert und für eine weitere Stunde in Phosphatpuffer 0,1 M gespült. Es folgte die Entwässerung in einer Saccharosereihe: Jeweils 1 Stunde lang wurden die Aggregate in Phosphatpuffer 0,1 M mit zunehmendem Saccharose-Gehalt (10 – 30 %) im Kühlschrank gelagert. Nach Zugabe eines Tropfen Tissue Tec konnten die entwässerten Aggregate bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Aggregate in Tissue Tec eingebettet und anschließend durch vorsichtiges Eintauchen in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Die entstandenen Blöcke wurden mit dem Kryotom zu 18 µm dicken Proben geschnitten und auf Gelatine-beschichtete Objektträger überführt.

2.2.4.2 DMMB-Färbung

Ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe sind sulfatierte Glykosaminoglykane (sGAG), die durch ihre hohe Wasserbindungskapazität zur Elastizität des Knorpels beitragen [75]. Der Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen diente daher zur Beurteilung des Grades der chondrogenen Differenzierung. Zur Messung der sGAG wurde 1,9-Dimethylmethylenblau-haltige Lösung verwendet (0,1% in H₂O) [76]. Je mehr sGAG im Knorpelgewebe enthalten ist, desto stärker wird die blaue Farbe des DMMB zu purpurfarben umgewandelt. Die Gefrierschnitte wurden für 5 – 10 Minuten mit DMMB inkubiert und anschließend kurz mit Wasser gespült. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe: Hierbei verweilten sie zweimal 5 Minuten in 96% Isopropanol, zweimal

10 Minuten in 100% Isopropanol und zweimal 10 Minuten in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mit DePex überzogen, mit Deckgläsern abgedeckt, mikroskopiert und abfotografiert.

2.2.4.3 Kollagen-Detektion mittels Immunhistochemie

Kollagen-I und Kollagen-II im Knorpelgewebe wurden mittels immunhistochemischer ABC-Methode nachgewiesen [77]. Entscheidend bei diesem Verfahren ist die Fähigkeit des Proteins Avidin, vier Einheiten des Vitamins Biotin zu binden. Zuerst bindet ein primärer Antikörper an das zu detektierende Gewebsantigen. Ein sekundärer Biotin-konjugierter Antikörper richtet sich gegen den Primär-Antikörper. Zur Verstärkung der nachfolgenden Farbreaktion werden Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe (ABC) zugegeben, wobei sich die noch freien Bindungsstellen des Avidin mit dem an den Sekundärantikörper gebundenen Biotin verbinden. Die Reaktion wird schließlich durch ein Chromogen, das oxidiert wird, sichtbar gemacht.

Zum Blockieren endogener Peroxidasen wurden die Schnitte für 30 Minuten in PBS mit 10% H₂O₂ und 10% Methanol eingelegt und anschließend in Halter luftblasenfrei eingespannt. Nun und zwischen den weiteren Arbeitsschritten wurden die Schnitte je 3 Mal mit Waschpuffer gespült. Es folgte die 15-minütige Inkubation mit Pepsinandauflösung zur Demaskierung des Kollagens. Um später eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte für 60 Minuten mit Blockingpuffer behandelt. Ohne die Schnitte zu waschen, wurden nun die primären monoklonalen Kollagen-TypI-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:200 in Blockingpuffer) bzw. Kollagen-TypII-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:100 in Blockingpuffer) zugefügt und über Nacht auf den Schnitten belassen. Die Negativkontrollen wurden nicht mit primären Antikörpern behandelt. Am folgenden Tag wurden die Primärantikörper abgewaschen und die Biotin-konjugierten polyklonalen sekundären Anti-Maus-IgG-Antikörper von der Ziege für 60 Minuten auf den Proben belassen. Anschließend folgte die Inkubation mit ABC-Lösung für 90 Minuten und die Entwicklung mit Hilfe des Chromogens in Form der DAB-Arbeitslösung. Nach Erscheinen der grau-braunen Färbung wurde die Reaktion durch Eintauchen in Waschpuffer abgestoppt. Die Schnitte wurden in H₂O gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit DePex überzogen, mit Deckgläsern abgedeckt und mikroskopiert.

2.2.4.4 Live-Dead-Staining

Um die Nekroseraten 24 bzw. 96 Stunden nach Lokalanästhetika-Behandlung zu bestimmen, wurden die Aggregate aus Versuchsgruppe 1 (siehe 2.2.2.2) mittels Live-Dead-Staining fluoreszenzmikroskopisch untersucht und ausgezählt.

Mit Hilfe zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe konnte das Verhältnis von lebenden zu abgestorbenen Zellen bestimmt werden.

Zum Nachweis vitaler Zellen diente der Fluoreszenzfarbstoff Calcein-Acetoxy-methylester (= Calcein-AM). Lebende Zellen zeichnen sich durch die ubiquitäre Präsenz intrazellulärer Esterasen aus. Dringt das Calcein-AM in vitale Zellen ein, spalten diese Esterasen den Acetoxy-methylester ab, sodass das nicht-fluoreszierende Calcein-AM zu Calcein umgewandelt wird. Das Calcein kann nun Calciumionen innerhalb der Zelle binden und fluoresziert grün. Lebende Zellen leuchten auf diese Weise grün, während abgestorbene Zellen farblos bleiben. Das Calcein-AM 4mM wurde im Verhältnis 1:1000 mit Chondrogenese-Medium verdünnt und die Aggregate wurden vor der Entnahme über Nacht mit dem Farbstoff inkubiert.

Zum Nachweis nekrotischer Zellen diente der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid-Homodimer-1 [78]. Ethidiumbromid durchdringt nur die beschädigten Zellmembranen toter Zellen, während die intakte Zellmembran vitaler Zellen es abhält. In den Zellen angekommen, interkaliert es mit der DNA, was zu einer etwa 40-fachen Verstärkung der Fluoreszenz von Ethidiumbromid führt. Nekrotische Zellen fluoreszieren somit leuchtend rot. Das Ethidiumbromid wurde im Verhältnis 1:1000 mit Chondrogenese-Medium verdünnt und die Aggregate wurden vor der Entnahme für 5 Stunden mit dem Farbstoff inkubiert.

Als Positivkontrolle für die Ethidiumbromid-Färbung dienten Aggregate, bei denen mehrmaliges Eintauchen in flüssigen Stickstoff zum Zelltod sämtlicher im Aggregat enthaltener Zellen führte. Im Folgenden werden diese Aggregate als Totaggregate bezeichnet.

2.2.4.5 Caspase-Staining

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurden die Aggregate aus Versuchsgruppe 1 (siehe 2.2.2.2) mittels Caspase-Staining untersucht. Hierzu wurde CellEvent Caspase-3/7

Green Detection Reagent verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Peptid aus vier Aminosäuren (Asp-Glu-Val-Asp), kurz DEVD, das mit einem Nukleinsäure-bindenden Farbstoff gekoppelt ist [79]. Das Reagens an sich ist nicht fluoreszierend, da die DEVD-Sequenz den Farbstoff daran hindert, an die DNA zu binden. Nach der Aktivierung von Caspase-3 oder Caspase-7 in apoptotischen Zellen wird die DEVD-Sequenz gespalten, sodass der Farbstoff an die DNA binden kann, was zu einer leuchtend grünen Fluoreszenz führt. Das Reagens wurde mit Chondrogenese-Medium im Verhältnis 1:500 verdünnt und die Aggregate wurden vor der Entnahme über Nacht mit der Arbeitsverdünnung inkubiert.

Um sowohl lebende als auch tote Zellen anzufärben, wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an doppelsträngige DNA anlagert und blau fluoresziert [80]. Es ist in der Lage, die Zellmembran sowohl lebender als auch toter Zellen zu passieren, wobei zum Eindringen in lebende Zellen höhere Konzentrationen gebraucht werden. Da DAPI durch die DNA-Bindung toxisch wirkt, wurde es im Gegensatz zu den anderen Farbstoffen nicht vor der Entnahme auf die Aggregate gegeben. Stattdessen wurden die Gefrierschnitte mit in H₂O gelöstem DAPI bedeckt und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

2.2.5 Biochemische Analysen

2.2.5.1 Probenverdau

Für die spätere Auswertung des DNA- und Kollagen-II-Gehalts wurden die Aggregate aus Versuchsgruppe 2 (siehe 2.2.2.3) zuerst mit Pepsin und Elastase verdaut, um sowohl die DNA als auch die einzelnen Kollagenmoleküle in Lösung zu bringen: Über je 4 der aufgetauten Aggregate wurden 200 µl Essigsäure-NaCl-Lösung gegeben und anschließend 25 µl Pepsin-Essigsäure-Lösung (10 mg/ml in 0,05 M Essigsäure) hinzugefügt. Über Nacht wurden die Proben auf einem Rotator im Kühlschrank bei 4 °C angedaut. Am nächsten Tag wurden die Proben für 5 Sekunden bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert und die Aggregate wurden mit Hilfe des Homogenisators zerkleinert. Nach einer erneuten Zugabe von 200 µl Essigsäure-NaCl-Lösung und 25 µl Pepsin-Essigsäure-Lösung wurden die Proben für weitere 48 Stunden auf dem Rotator im Kühlschrank bei 4 °C angedaut. Anschließend wurden die Cups

mit den Proben abzentrifugiert. Jedem Cup wurden 50 µl 10xTBS hinzugefügt und der pH wurde mit Hilfe von pH-Papier unter Zugabe von NaOH auf 8,0 eingestellt. Nach Zugabe von je 50 µl Elastase (1 mg/ml in 1xTBS, pH = 7,8 - 8,0) wurden die Proben weitere 24 Stunden auf dem Rotator im Kühlschrank verdaut. Anschließend erfolgte die Zentrifugierung bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten, damit sich unverdaute Überreste absetzen konnten. Der Überstand wurde als Probenmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

2.2.5.2 DNA-Bestimmung mittels Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit

Die Bestimmung des DNS-Gehalts der Aggregate aus Versuchsgruppe 2 (siehe 2.2.2.3) erfolgte mit dem Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit. Dies ist eine sehr sensitive Methode, um in Lösung befindliche Doppelstrang-DNA mittels Fluoreszenzmessung zu detektieren. Dabei wurde gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll vorgegangen: Der 20xTE-Puffer wurde zunächst mittels Aqua destillatum zu 1xTE-Puffer verdünnt. Anschließend wurde der Quant-iT™ PicoGreen Reagent im Verhältnis 1:200 mit 1xTE-Puffer verdünnt. Wegen der hohen Anfälligkeit der Lösung für Fotodegeneration war darauf zu achten, die Lösung lichtgeschützt aufzubewahren und innerhalb weniger Stunden zu verarbeiten.

Zuerst wurde eine DNA-Standardkurve erstellt. Dazu wurde eine sogenannte Lambda-DNA-Stocklösung verwendet. In 1xTE-Puffer wurden DNA-Proben mit den Konzentrationen 2/1/0,5/0,25/0,125/0,0625/0,0312 µg/ml angesetzt und davon je 100 µl pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Als Blank wurde der 1xTE-Puffer verwendet.

Die Proben aus den verdauten Aggregaten wurden im Verhältnis 1:15 mit TE-Puffer verdünnt und es wurden 100 µl pro Well in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Jede Probe wurde zweifach vermessen, um genauere Werte zu erhalten.

Anschließend wurden jeweils 100 µl pro Well von dem vorher zubereiteten Pico Green Reagens hinzu pipettiert. Die befüllten Mikrotiterplatten wurden für 3 bis 5 Minuten lichtgeschützt inkubiert und anschließend mit Hilfe des Photometers bei einer Anregung von 480 nm und einer Emission von 529 nm vermessen. Die DNA-Konzentration der Proben konnte

mittels der erstellten DNA-Standardkurve ermittelt werden. Die gemessenen Werte wurden in einer Excel-Tabelle dargestellt und ausgewertet.

2.2.5.3 Kollagen-II-Bestimmung mittels Chondrex Type II Collagen Detection Kit

Die Bestimmung des Kollagen-II-Gehalts der Aggregate aus Versuchsgruppe 2 (siehe 2.2.2.3) erfolgte mittels des Chondrex Type II Collagen Detection Kit, das sich der Methode des Sandwich-ELISA bedient [81]: Dabei wird das zu messende Antigen zuerst von einem auf der Mikrotiterplatte fest haftenden Antikörper (sog. Capture-Antikörper) spezifisch gebunden. Ein zweiter Biotin-gekoppelter Antikörper (sog. Detection-Antikörper) bindet an das Antigen, sodass dieses wie in einem Sandwich zwischen den beiden Antikörpern gebunden ist. Es wird Streptavidin-Peroxidase-Komplex hinzugefügt und das Streptavidin bindet nicht-kovalent über das Biotin an den Detection-Antikörper. Anschließend wird das Farbstoffsubstrat o-Phenylendiamin (OPD) hinzugefügt, das von der Peroxidase umgesetzt wird und so zu fluoreszieren beginnt. Von der Stärke der Fluoreszenz kann mit Hilfe einer Standardkurve auf die Menge des gesuchten Antigens geschlossen werden.

Die Messung des Kollagen-II erfolgte nach den Angaben des Herstellers: Der Capture-Antikörper wurde im mitgelieferten Lösungspuffer aufgelöst und es wurden je 100 µl Capture-Antikörper-Lösung pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden am nächsten Tag mit Waschpuffer entfernt. Für die Erstellung einer Kollagen-II-Standardkurve wurde die mitgelieferte Standardlösung (100 µg/ml Kollagen-II) mit Lösungspuffer auf die Konzentrationen 200/100/50/25/12,5/6,25/3,125 ng/ml verdünnt. Als Blank wurde der reine Lösungspuffer verwendet. Die Proben aus den verdauten Aggregaten wurden im Verhältnis 1:15 mit Lösungspuffer verdünnt.

Von den Proben/Standards/Blank wurden je 100 µl auf die mit dem Primär-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten pipettiert. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt, um eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen. Der Biotin-gekoppelte Detection-Antikörper wurde in dem mitgelieferten Lösungspuffer aufgelöst und die vorgelegten Proben wurden mit je 50 µl der Detection-Antikörper-Lösung vermischt und für 2 Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen

Detection-Antikörper mit Waschpuffer entfernt. Je 100 µl des im dafür vorgesehenen Puffer aufgelösten Streptavidin-Peroxidase-Komplexes wurden in die Wells pipettiert und für 1 Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden ein weiteres Mal mit Waschpuffer gespült. Anschließend wurden je 100 µl OPD-Lösung hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden je 50 µl 2N Schwefelsäure pro Well hinzugegeben. Anschließend wurden die Platten im Photometer bei 490 nm ausgelesen. Zur graphischen Darstellung wurde Microsoft Office Excel verwendet.

2.2.6 Statistik

Um die einzelnen Zellreihen untereinander vergleichen zu können, erfolgte die quantitative Analyse der einzelnen Versuchsteile. Die Mittelwerte und die die Standardabweichung wurden für die ermittelten Werte berechnet. Die unterschiedlichen Gruppen wurden mit einer Analysis of Variance (ANOVA) mit dem Dunnett post-hoc-Test verglichen. Hierfür wurde SPSS 19.0 für Windows verwendet. Bei $p < 0,05$ wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopie

Die Aggregate wurden an Tag 7, Tag 14 und Tag 21 bei 1,5-facher Vergrößerung fotografiert, um ihr Größenwachstum sowie die makroskopische Entwicklung der Aggregatoberfläche zu beurteilen.

Es zeigte sich, dass die Aggregate mit zunehmender Kultivierungsdauer an Größe zunahmen. Die Oberfläche wurde von Tag 7 über Tag 14 bis Tag 21 glatter und heller. Während die Aggregate an Tag 7 eher instabil und verformbar waren, gewannen sie bis Tag 21 zunehmend an Festigkeit und Stabilität. An Tag 21 ähnelten die Aggregate in Konsistenz und Aussehen hyalinem Knorpelgewebe. Ein Unterschied zwischen den Kontrollaggregaten und den mit Lokalanästhetika behandelten Aggregaten war nicht festzustellen.

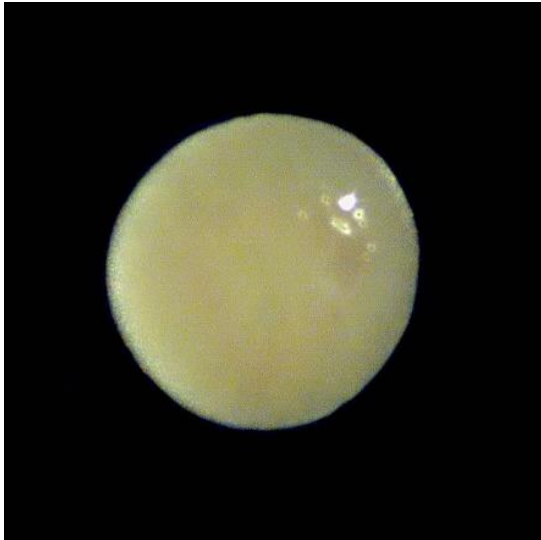


Abbildung 3-1: Aggregat d7, makroskopisch, 1,5x, LN 823

Abbildung 3-1 zeigt ein Aggregat an Tag 7 bei 1,5-facher Vergrößerung. Die Oberfläche war noch etwas uneben, die Farbe leicht gelblich.

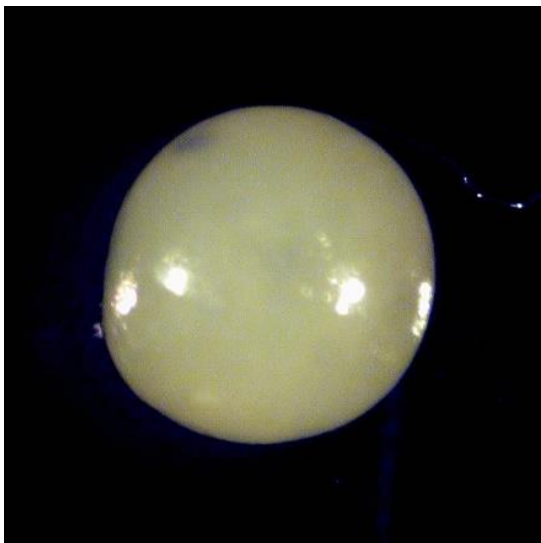


Abbildung 3-2: Aggregat d14, makroskopisch, 1,5x, LN 823

Abbildung 3-2 zeigt ein Aggregat an Tag 14 bei 1,5-facher Vergrößerung. Im Vergleich zu dem Aggregat von Tag 7 konnte ein leichtes Größenwachstum festgestellt werden.

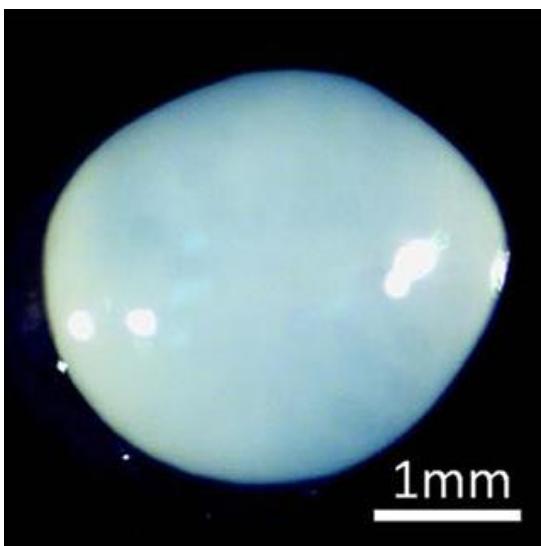


Abbildung 3-3: Aggregat d21, makroskopisch, 1,5x, LN 823

Abbildung 3-3 zeigt ein Aggregat an Tag 21 bei 1,5-facher Vergrößerung. Im Vergleich zu den Aggregaten von Tag 7 und Tag 14 war dieses Aggregat weißer und die Oberfläche war glatter wie bei hyalinem Knorpelgewebe. Außerdem fiel ein weiteres Größenwachstum auf.

3.2 DMMB-Färbung

Zur Messung des Gehalts an sulfatierten Glykosaminoglykanen wurde eine DMMB-Färbung durchgeführt. Als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe dienen die sulfatierten Glykosaminoglykanen zur Beurteilung des Grades der chondrogenen Differenzierung. Je mehr sGAG im Knorpelgewebe enthalten war, desto stärker veränderte sich die blaue Farbe des DMMB zu purpurfarben.

In der DMMB-Färbung zeigten die Aggregate aller Zellreihen einen beträchtlich zunehmenden Gehalt von sGAG von Tag 7 über Tag 14 zu Tag 21. In Bezug zur Zelldichte vermehrte sich die extrazelluläre Matrix mit zunehmender Kultivierungsdauer von Tag 7 über Tag 14 bis Tag 21. Die Zellen wurden bis Tag 21 zunehmend von der purpurn gefärbten, glykosaminoglykanreichen extrazellulären Matrix auseinandergedrängt.

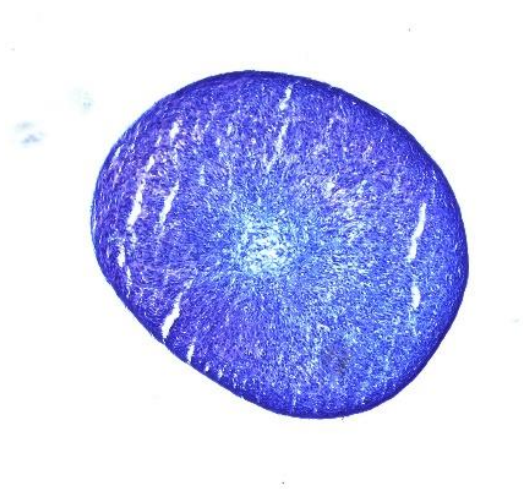


Abbildung 3-4: Aggregat d7, DMMB-Färbung, 4x, LN 823

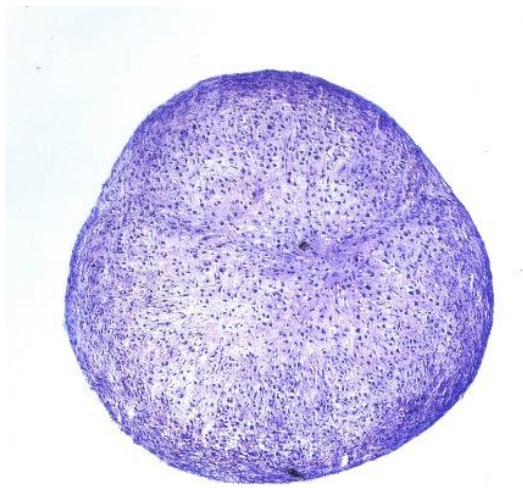


Abbildung 3-5: Aggregat d14, DMMB-Färbung, 4x, LN 823

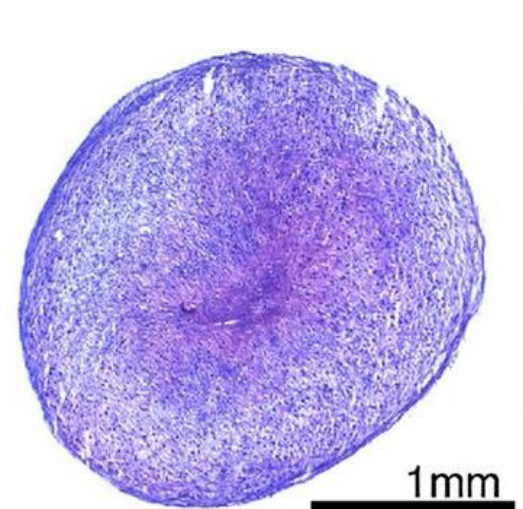


Abbildung 3-6: Aggregat d21, DMMB-Färbung, 4x, LN 823

Abbildung 3-4 zeigt ein Aggregat von Tag 7 in DMMB-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. An Tag 7 lagen die Zellen sehr dicht beieinander und es zeigte sich nur wenig extrazelluläre Matrix. Die DMMB-Färbung war bläulich, was auf einen geringen Gehalt an sGAG schließen ließ.

Abbildung 3-5 zeigt ein Aggregat an Tag 14 in DMMB-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. An Tag 14 wurden die Zellen bereits von der zunehmenden extrazellulären Matrix auseinandergedrängt. Die DMMB-Färbung war im Vergleich zu Tag 7 mehr purpurfarben. Außerdem war von Tag 7 auf Tag 14 ein deutliches ein Größenwachstum festzustellen.

Abbildung 3-6 zeigt ein Aggregat an Tag 21 in DMMB-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Im Vergleich zu den Aggregaten von Tag 7 und Tag 14 zeigten die Aggregate an Tag 21 eine leuchtend purpurfarbene Färbung, was für einen hohen Gehalt an sGAG und somit für eine gute chondrogene Differenzierung spricht.

3.3 Kollagen-I und Kollagen-II in der Immunhistologie

Kollagen-I und Kollagen-II im Knorpelgewebe wurden mittels immunhistochemischer ABC-Methode nachgewiesen. Dabei wurde das vorhandene Kollagen jeweils grau-braun angefärbt, während der Rest des Aggregats farblos blieb. Anhand des Anteils an Kollagen-I und Kollagen-II konnte auf den Grad der chondrogenen Differenzierung geschlossen werden.

Typ-I-Kollagen wurde vor allem an der Oberfläche sowie in den oberflächlichen Schichten produziert. Von Tag 7 über Tag 14 bis Tag 21 nahm der Gehalt an Kollagen-I in den Aggregaten kontinuierlich zu.

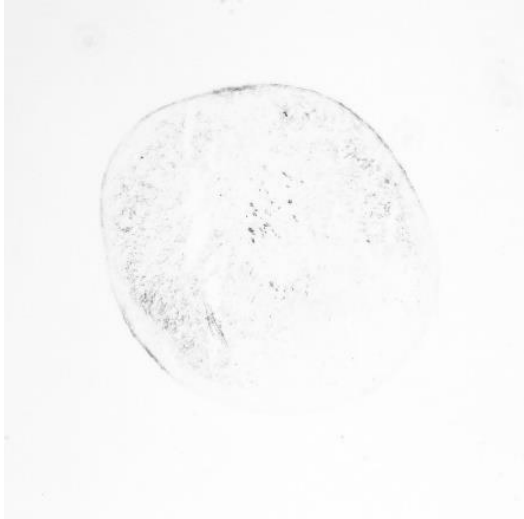


Abbildung 3-7: Aggregat d7, Immunhistologie Kollagen I, 4x, LN 823

Abbildung 3-7 zeigt ein Aggregat an Tag 7 in Kollagen-I-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Es zeigte sich nur eine spärlich grau-braune Anfärbung, was auf kaum vorhandenes Kollagen-I hinweist.

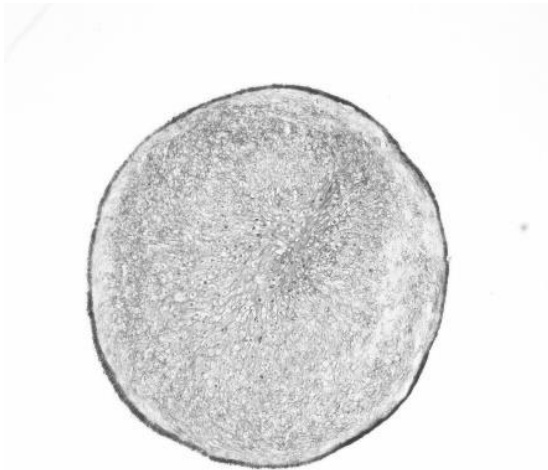


Abbildung 3-8: Aggregat d14, Immunhistologie Kollagen I, 4x, LN 823

Abbildung 3-8 zeigt ein Aggregat an Tag 14 in Kollagen-I-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Im Vergleich zu Tag 7 zeigte sich nun eine deutliche grau-braune Färbung mit Betonung der Randbereiche.

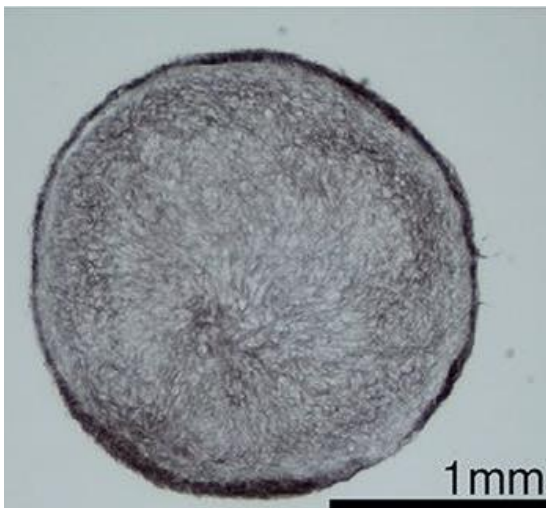


Abbildung 3-9: Aggregat d21, Immunhistologie Kollagen I, 4x, LN 823

Abbildung 3-9 zeigt ein Aggregat an Tag 21 in Kollagen-I-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Im Vergleich zu den Aggregaten von Tag 7 und Tag 14 war die grau-braune Färbung stark ausgeprägt mit einer ringförmigen Betonung der oberflächlichen Schichten, was auf einen hohen Kollagen-I-Gehalt schließen ließ.

Während an Tag 7 kein Kollagen-II gefunden werden konnte, stieg die Proteinexpression bis Tag 21 deutlich an.

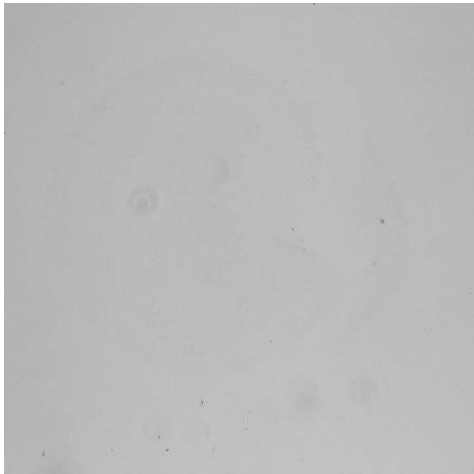


Abbildung 3-10: Aggregat d7, Immunhistologie Kollagen-II, 4x, LN 825

Abbildung 3-10 zeigt ein Aggregat an Tag 7 mit Kollagen-II-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Zu diesem Zeitpunkt der Chondrogenese war offenbar noch kein Kollagen-II produziert worden, sodass es zu keinerlei Anfärbung des Aggregats kam.

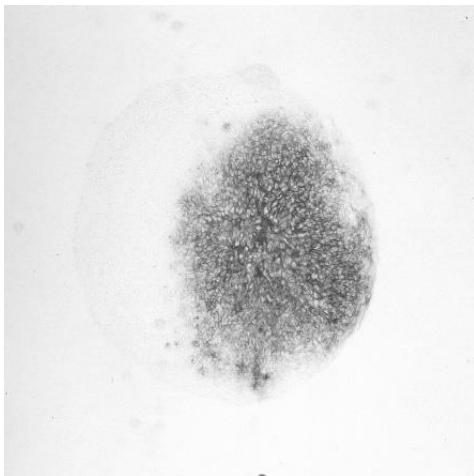


Abbildung 3-11: Aggregat d14, Immunhistologie Kollagen-II, 4x, LN 825

Abbildung 3-11 zeigt ein Aggregat an Tag 14 mit Kollagen-II-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Im Gegensatz zu Tag 7 hatte sich in einem Teil des Aggregats Kollagen-II gebildet, was zu einer grau-braunen Anfärbung eines begrenzten Bereichs des Aggregats führte.

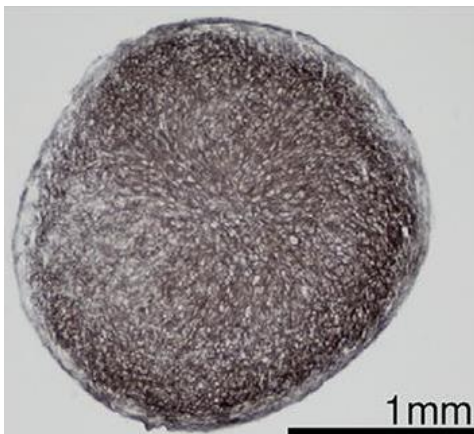


Abbildung 3-12: Aggregat d21, Immunhistologie Kollagen-II, 4x, LN 825

Abbildung 3-12 zeigt ein Aggregat an Tag 21 mit Kollagen-II-Färbung bei 4-facher Vergrößerung. Im Gegensatz zu Tag 14 kam es zu einer gleichmäßigen dunklen grau-braunen Färbung im gesamten Aggregat, was auf einen hohen Anteil von Kollagen-II und somit auf eine gute chondrogene Differenzierung schließen ließ.

3.4 Live-Dead-Staining

Die Untersuchung der Nekroseraten 24 bzw. 96 Stunden nach Lokalanästhetika-Behandlung erfolgte mittels Live-Dead-Staining. Hierzu wurden Aggregate an Tag 7, Tag 14 bzw. Tag 21 für eine Stunde mit äquipotenten Konzentrationen von Bupivacain, Mepivacain bzw. Ropivacain behandelt. Die Anzahl der nekrotischen Zellen in den Aggregaten wurde 24 bzw. 96 Stunden später fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Nekrotische Zellen fluoreszierten durch die Anreicherung von Ethidiumbromid leuchtend rot, während vitale Zellen aufgrund des Calceins grün fluoreszierten.

Im Folgenden werden die Effekte von 0,5 % Bupivacain im Vergleich zur Kontrolle 96 Stunden nach Belastung zu verschiedenen Zeitpunkten der Chondrogenese exemplarisch dargestellt: An Tag 7 (siehe Abb. 3-13) fand sich vor allem in den äußeren Schichten mit $15 \pm 5,5$ % ($p < 0,001$; Dunnett) eine hohe Anzahl rot fluoreszierender und damit nekrotischer Zellen. Die Nekroserate erhöhte sich leicht von 24 zu 96 Stunden nach Behandlung. Im Vergleich dazu gab es im Kontrollaggregat an Tag 7 (siehe Abb. 3-14) mit $4,5 \pm 1,6$ % ($p < 0,001$; ANOVA) wenige nekrotische Zellen und stattdessen einen hohen Anteil vitaler, grün fluoreszierender MSCs. An Tag 14 (siehe Abb. 3-15) war die Anzahl nekrotischer Zellen nach LA-Behandlung mit $14 \pm 3,7$ % ($p < 0,001$; Dunnett) im Vergleich zu $4,7 \pm 1,6$ % ($p < 0,001$; ANOVA) in der Kontrolle nach wie vor erhöht (siehe Abb. 3-15). In Abb. 3-16 ist exemplarisch ein Totaggregat aus der Kontrollgruppe dargestellt. Die oberflächliche Schicht mit Zellnekrosen verschmälerte sich mit zunehmender Differenzierungszeit. An Tag 21 (siehe Abb. 3-17) zeigten die Aggregate mit $8,2 \pm 2,6$ % im Vergleich zu $5,5 \pm 1,4$ % ($p > 0,05$; ANOVA) nekrotische Zellen in der Kontrolle nur noch vereinzelte nekrotische Zellen an der Oberfläche und eine vergleichbare zelluläre Dichte wie die Kontrolle (siehe Abb. 3-18).

Mepivacain und Ropivacain zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die mit reinem Natriumchlorid behandelten Aggregate zeigten gleich niedrige Nekroseraten wie die Aggregate in der Kontrollgruppe.

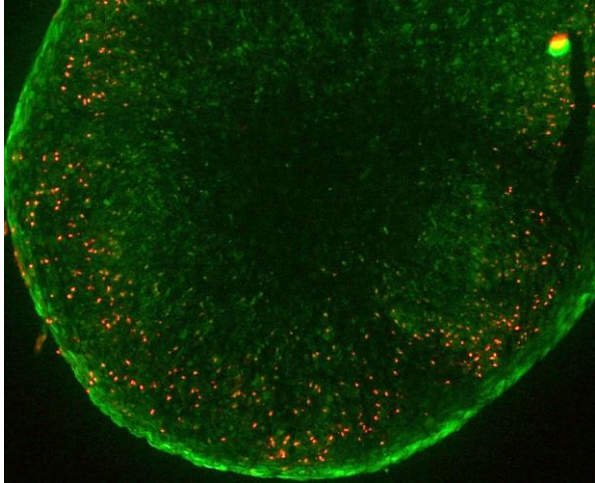


Abbildung 3-13: Aggregat d7, Bupivacain, Live/Dead, 10x, LN 798

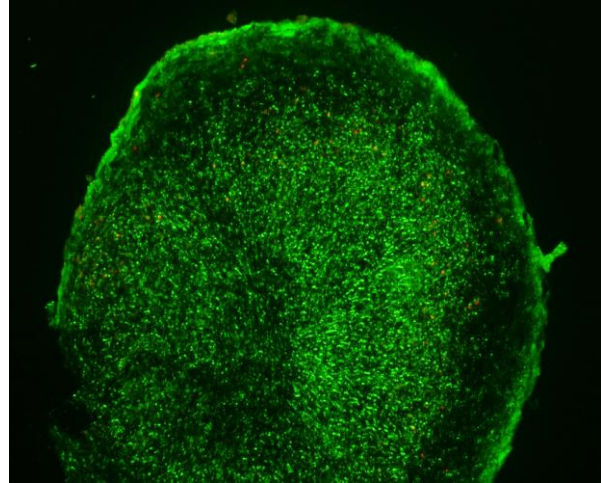


Abbildung 3-14: Aggregat d7, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN 798

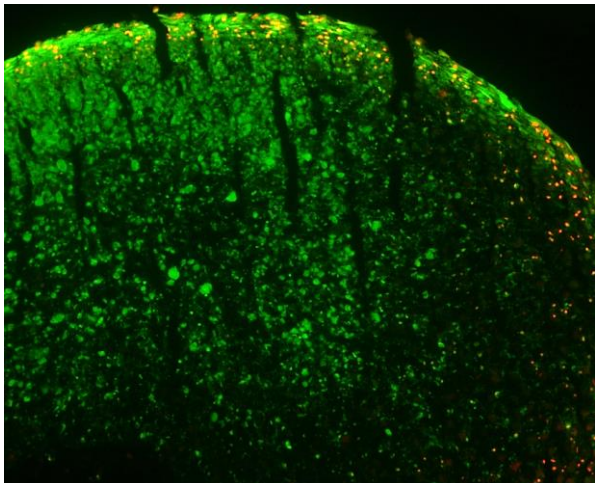


Abbildung 3-15: Aggregat d14, Bupivacain, Live/Dead, 10x, LN 798

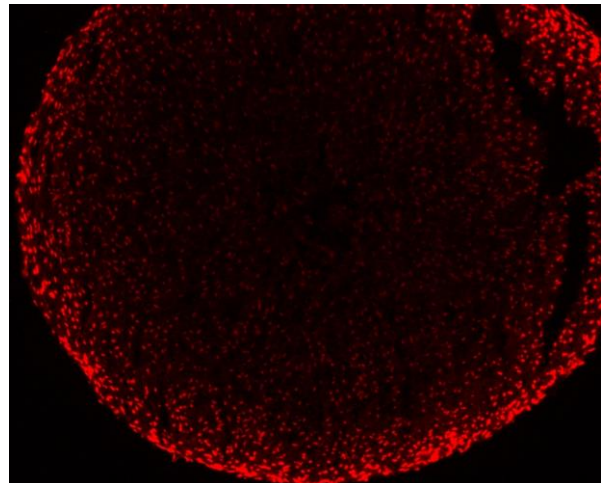


Abbildung 3-16: Aggregat d14, Kontrolle Totaggregat, Live/Dead, 10x, LN 798

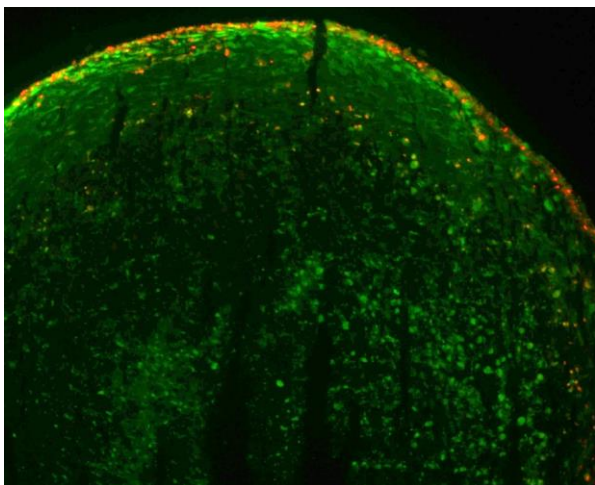


Abbildung 3-17: Aggregat d21, Bupivacain, Live/Dead, 10x, LN 798

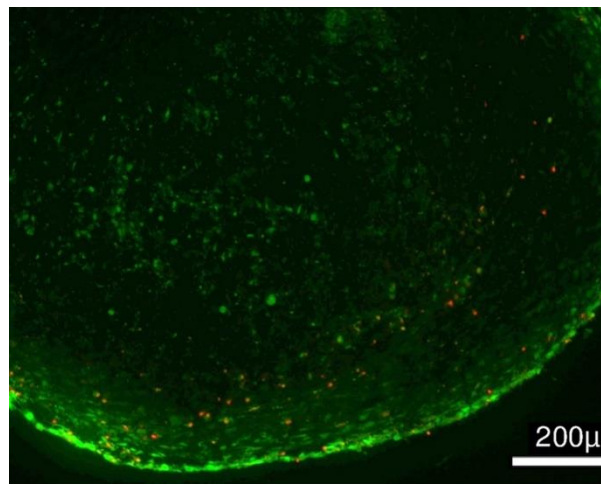


Abbildung 3-18: Aggregat d21, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN 798

Wie in den obigen Abbildungen zu erkennen ist, waren die einzelnen grün fluoreszierenden MSCs schwer voneinander abgrenzbar. Eine Auszählung der vitalen Zellen war deshalb mit der Calcein-Färbung schwer durchführbar. Für die quantitative Analyse wurden die Gefrierschnitte daher vor dem Mikroskopieren mit DAPI überzogen. Die Anfärbung mit dem blau fluoreszierenden DAPI diente dazu, sämtliche Zellen des Aggregats unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, um das Verhältnis der nekrotischen Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmen zu können.

Die Effekte von 0,75 % Ropivacain auf die Vitalität von MSCs in verschiedenen Stadien der Chondrogenese 96 Stunden nach Behandlung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt: An Tag 7 zeigten mit Ropivacain behandelte Aggregate (siehe Abb. 3-19) 24 Stunden nach Behandlung $12 \pm 2,8 \%$ ($p < 0,001$; Dunnett) nekrotische Zellen und 96 Stunden nach Behandlung $13 \pm 3,7 \%$ ($p < 0,001$; Dunnett) nekrotische Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit $4,9 \pm 1,3 \%$ ($p < 0,001$; ANOVA) nekrotische Zellen nach 24 Stunden bzw. $4,5 \pm 1,6 \%$ ($p < 0,001$; ANOVA) nekrotische Zellen nach 96 Stunden (siehe Abb. 3-20).

An Tag 14 (Abb. 3-21) zeigten die mit Ropivacain behandelten Aggregate $9 \pm 3,1 \%$ ($p = 0,003$; Dunnett) nekrotische Zellen nach 24 Stunden und $12 \pm 3,8 \%$ ($p = 0,001$; Dunnett) nekrotische Zellen nach 96 Stunden im Vergleich zu $3,7 \pm 1,8 \%$ (nach 24 Stunden) bzw. $4,7 \pm 1,6 \%$ (nach 96 Stunden) nekrotische Zellen im Kontrollaggregat (siehe Abb. 3-22).

An Tag 21 (siehe Abb. 3-23) zeigten die behandelten Aggregate mit $8,4 \pm 4,3 \%$ bzw. $8,6 \pm 2,6 \%$ nur noch vereinzelte nekrotische Zellen entlang der oberflächlichen Schichten. Es bestand kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle (siehe Abb. 3-24) mit $5,1 \pm 2,8 \%$ ($p > 0,05$; ANOVA) nekrotischer Zellen nach 24 Stunden bzw. $5,5 \pm 1,4 \%$ ($p > 0,05$; ANOVA) nekrotischer Zellen nach 96 Stunden.

Die Oberfläche der Aggregate befindet sich in den Abbildungen unten.

Mepivacain und Bupivacain zeigten vergleichbare Ergebnisse.

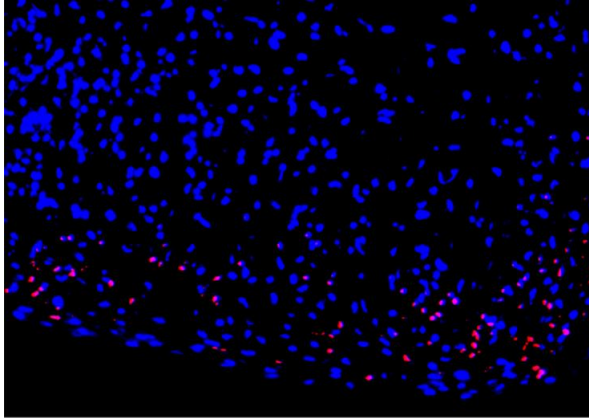


Abbildung 3-19: Aggregat d7, Ropivacain, Live/Dead, 10x, LN798

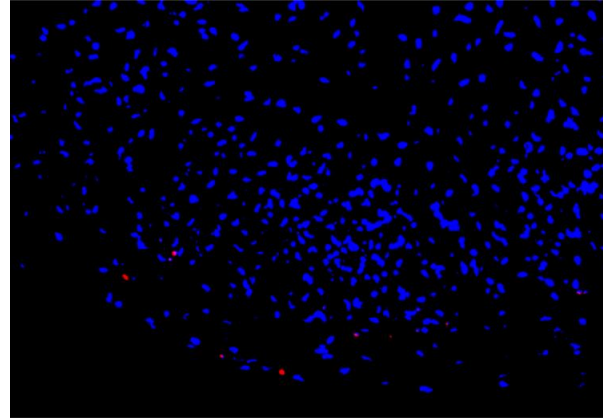


Abbildung 3-20: Aggregat d7, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN798

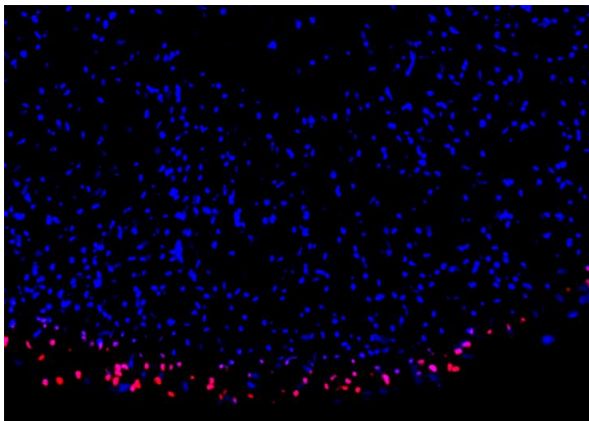


Abbildung 3-21: Aggregat d14, Ropivacain, Live/Dead, 10x, LN798

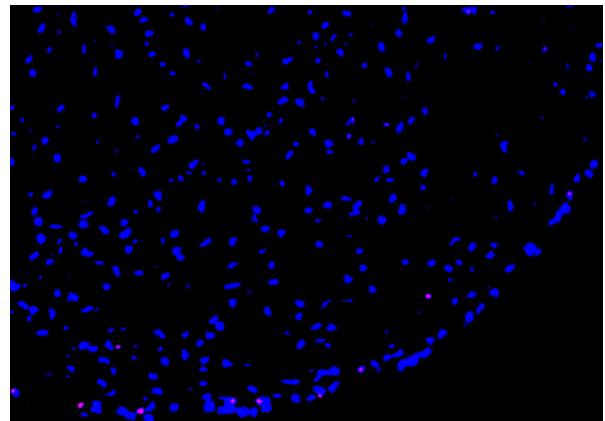


Abbildung 3-22: Aggregat d14, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN 798

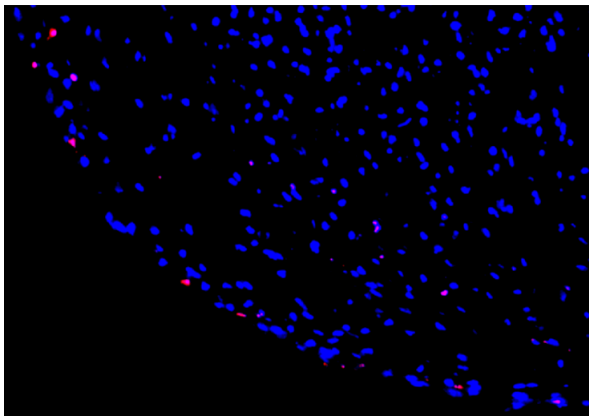


Abbildung 3-23: Aggregat d21, Ropivacain, Live/Dead, 10x, LN798

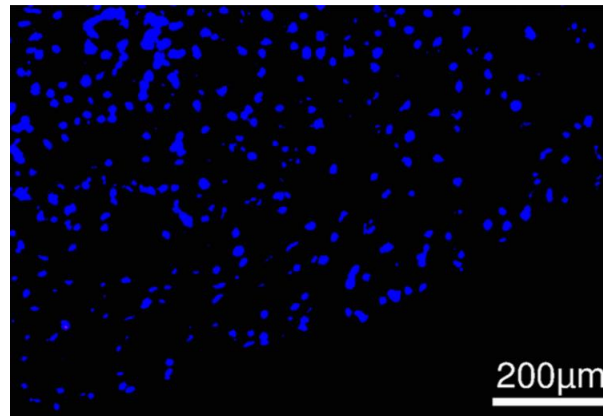


Abbildung 3-24: Aggregat d21, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN798

Abbildung 3-25 und Tabelle 3-1 zeigen die quantitative Analyse der Nekroseraten 24 und 96 Stunden nach einer einstündigen Belastung mit den einzelnen Lokalanästhetika. In Aggregaten, die 7 und 14 Tage lang chondrogen differenziert hatten, waren die Nekroseraten im Vergleich zur Kontrolle in allen Gruppen 24 und 96 Stunden nach Behandlung erhöht. Maximale zytotoxische Effekte wurden nach 96 Stunden festgestellt. Hinsichtlich der Vitalität zeigten sich in Aggregaten an Tag 21 keine Unterschiede.

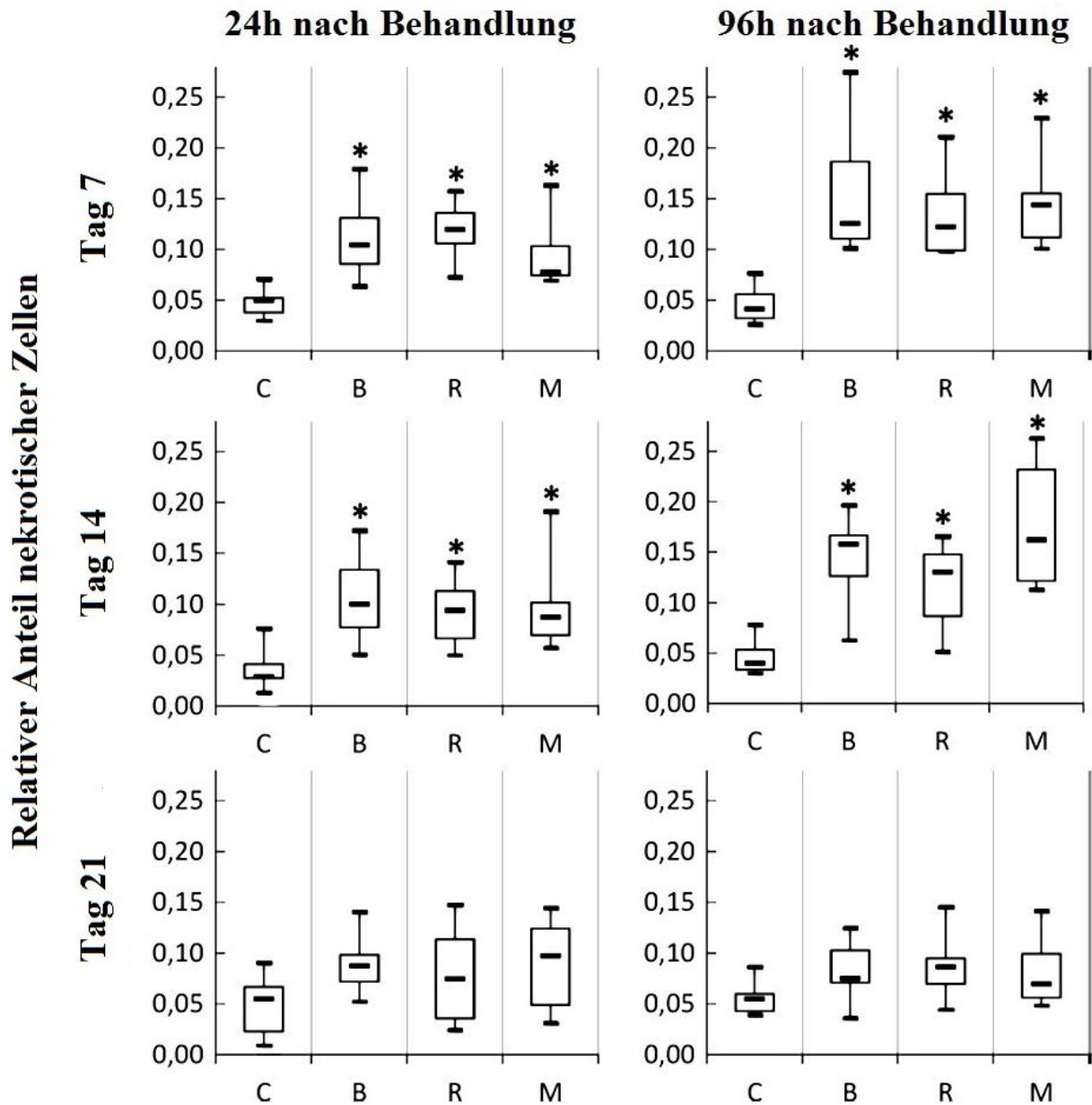


Abbildung 3-25: Nekroseraten 24 und 96 Stunden nach einer einstündigen Belastung mit 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain bzw. 2 % Mepivacain zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Chondrogenese. Die Werte auf der Skala stellen den Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtzellzahl im Aggregat dar. Die Daten werden als Boxplot dargestellt, wobei die Boxen dem Bereich entsprechen, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Die horizontalen Linien außerhalb der Boxen repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte aus neun Experimentreihen. C = Kontrolle; B = Bupivacain; R = Ropivacain; M = Mepivacain. * $p < 0,01$.

Tabelle 3-1: MSC Nekroseraten 24 und 96 Stunden nach Behandlung mit 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain und 2% Mepivacain in unterschiedlichen Stadien der Chondrogenese. MV = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Tag der LA-Gabe	Stunden nach LA-Gabe	Kontrolle [MV ± SD (ANOVA)]	Bupivacain [MV ± SD (Dunnett)]	Ropivacain [MV ± SD (Dunnett)]	Mepivacain [MV ± SD (Dunnett)]
Tag 7	24	4,9 ± 1,3 % (p<0,001)	11 ± 4,0 % (p<0,001)	12 ± 2,8 % (p<0,001)	10 ± 3,5 % (p=0,005)
	96	4,5 ± 1,6 % (p<0,001)	15 ± 5,5 % (p<0,001)	13 ± 3,7 % (p<0,001)	15 ± 4,5 % (p<0,001)
Tag 14	24	3,7 ± 1,8 % (p<0,001)	11 ± 4,1 % (p<0,001)	9 ± 3,1 % (p=0,003)	10 ± 4,0 % (p=0,002)
	96	4,7 ± 1,6 % (p<0,001)	14 ± 3,7 % (p<0,001)	12 ± 3,8 % (p=0,001)	17 ± 5,5 % (p<0,001)
Tag 21	24	5,1 ± 2,8 % (p>0,05)	9,1 ± 2,7 %	8,4 ± 4,3 %	9,0 ± 4,0 %
	96	5,5 ± 1,4 % (p>0,05)	8,2 ± 2,6 %	8,6 ± 2,6 %	7,9 ± 2,9 %

3.5 Caspase-Aktivität

Die Untersuchung der Apoptoseraten 24 bzw. 96 Stunden nach Lokalanästhetika-Behandlung erfolgte mittels Caspase-Detektion. Hierzu wurden Aggregate an Tag 7, Tag 14 bzw. Tag 21 für eine Stunde mit äquipotenten Konzentrationen von Bupivacain, Mepivacain bzw. Ropivacain behandelt. Die Anzahl der apoptotischen Zellen in den Aggregaten wurde 24 bzw. 96 Stunden später fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Apoptotische Zellen fluoreszierten wegen des Caspase-Stainings leuchtend grün. Die Anfärbung mit dem blau fluoreszierenden DAPI diente dazu, sämtliche Zellen des Aggregats unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, um das Verhältnis der apoptotischen Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmen zu können.

Die Effekte von 0,5 % Bupivacain auf die Apoptoseraten von MSCs in verschiedenen Stadien der Chondrogenese 96 Stunden nach einstündiger Exposition werden in den folgenden Abbildungen dargestellt: An Tag 7 (siehe Abb. 3-26) fand sich vor allem in den äußeren Schichten eine hohe Anzahl grün fluoreszierender, apoptotischer Zellen. Im Vergleich dazu gab es im Kontrollaggregat an Tag 7 (siehe Abb. 3-27) wenige apoptotische Zellen. Die Rate an apoptotischen mesenchymalen Stammzellen erhöhte sich von 24 Stunden bis 96 Stunden nach Belastung. An Tag 14 war die Anzahl apoptotischer Zellen nach LA-Behandlung nach wie vor erhöht (siehe Abb. 3-28), während die Kontrolle kaum apoptotische MSCs aufwies (siehe Abb. 3-29). Auch hier zeigten sich 96 Stunden nach Belastung mehr apoptotische Zellen als 24 Stunden nach Belastung. Mit zunehmender Differenzierung verringerte sich die Tiefe der Schicht mit apoptotischen mesenchymalen Stammzellen. An Tag 21 zeigten die Aggregate nur noch vereinzelt apoptotische Zellen (siehe Abb. 3-30) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3-31).

Die Oberfläche der Aggregate befindet sich in den Abbildungen oben.

Mepivacain und Ropivacain zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die mit reinem Natriumchlorid behandelten Aggregate zeigten gleich niedrige Apoptoseraten wie die Aggregate in der Kontrollgruppe.

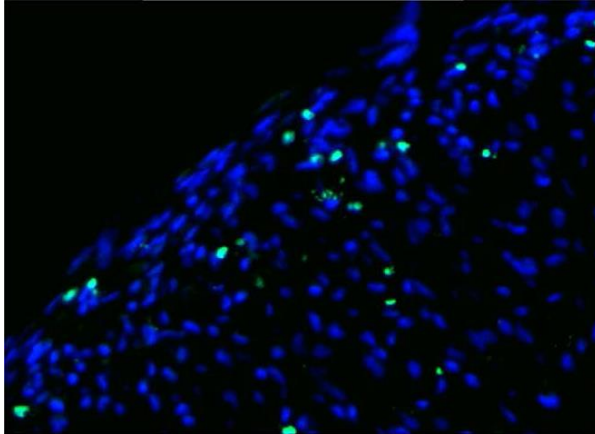


Abbildung 3-26: Aggregat d7, Bupivacain, Caspase, 10x, LN 823

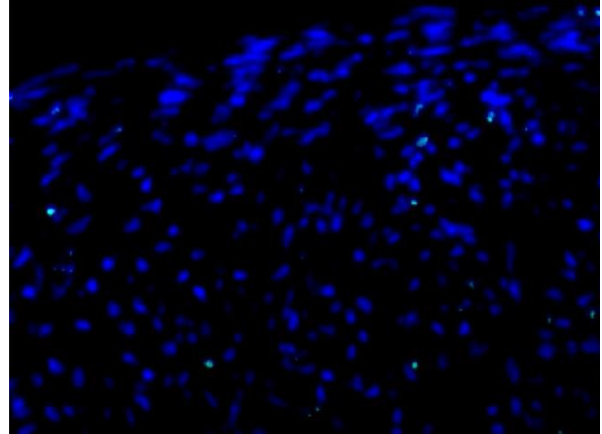


Abbildung 3-27: Aggregat d7, Kontrolle, Caspase, 10x, LN 823

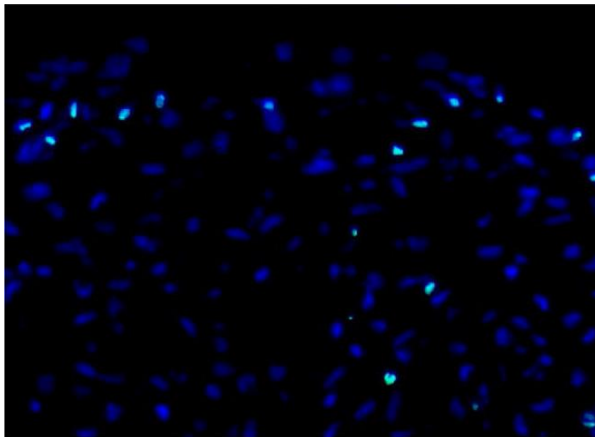


Abbildung 3-28: Aggregat d14, Bupivacain, Caspase, 10x, LN 823

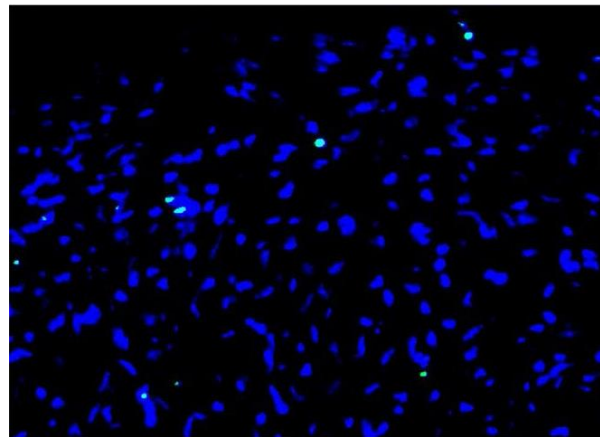


Abbildung 3-29: Aggregat d14, Kontrolle, Caspase, 10x, LN 823

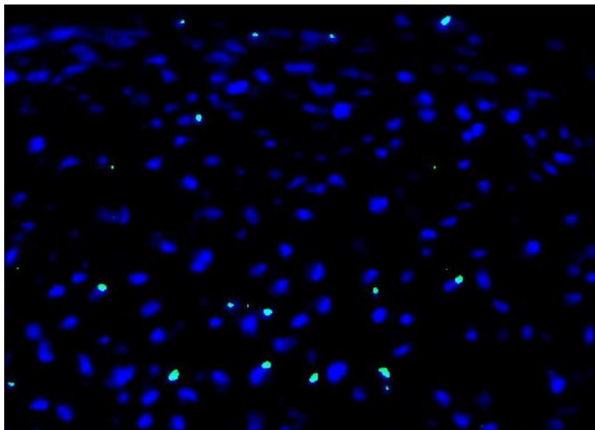


Abbildung 3-30: Aggregat d21, Bupivacain, Caspase, 10x, LN 823

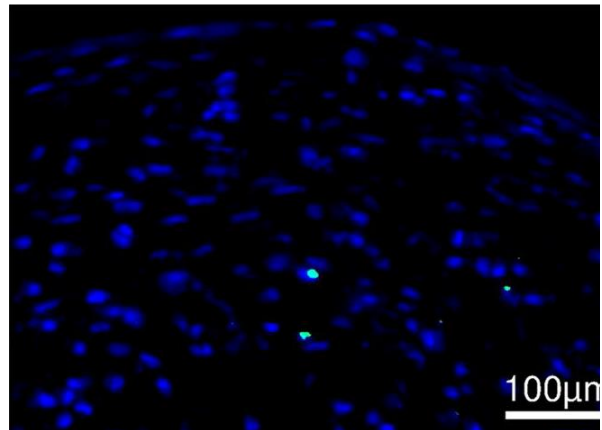


Abbildung 3-31: Aggregat d21, Kontrolle, Caspase, 10x, LN823

Unabhängig davon, ob Aggregate mit Lokalanästhetika belastet worden waren oder der Kontrollgruppe angehörten, zeigten Areale mit höherer Zelldichte höhere Apoptoseraten. Dieser Sachverhalt wird exemplarisch in den folgenden Abbildungen dargestellt: Abbildung 3-32 zeigt ein Aggregat aus der Kontrollgruppe in der Durchlichtmikroskopie bei 10-facher Vergrößerung. Dabei fällt im rechten unteren Bildrand eine erhöhte Dichte mesenchymaler Stammzellen auf. Abbildung 3-33 zeigt denselben Ausschnitt des gleichen Aggregats in der Caspase-Färbung. Dabei fällt auf, dass es in dem Bereich mit erhöhter Zelldichte auch zu erhöhten Apoptoseraten kam.

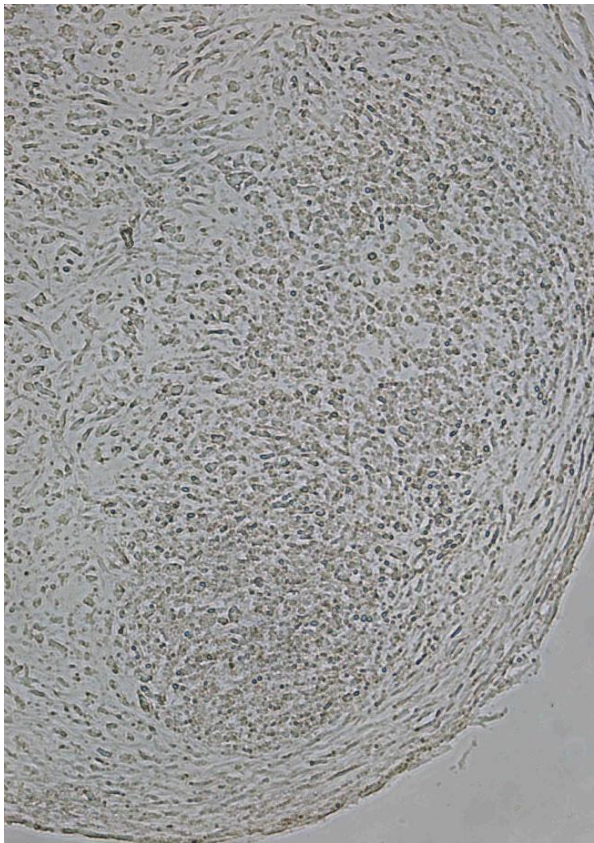


Abbildung 3-32: Aggregat d21, Kontrolle, Durchlicht, 10x, LN 798

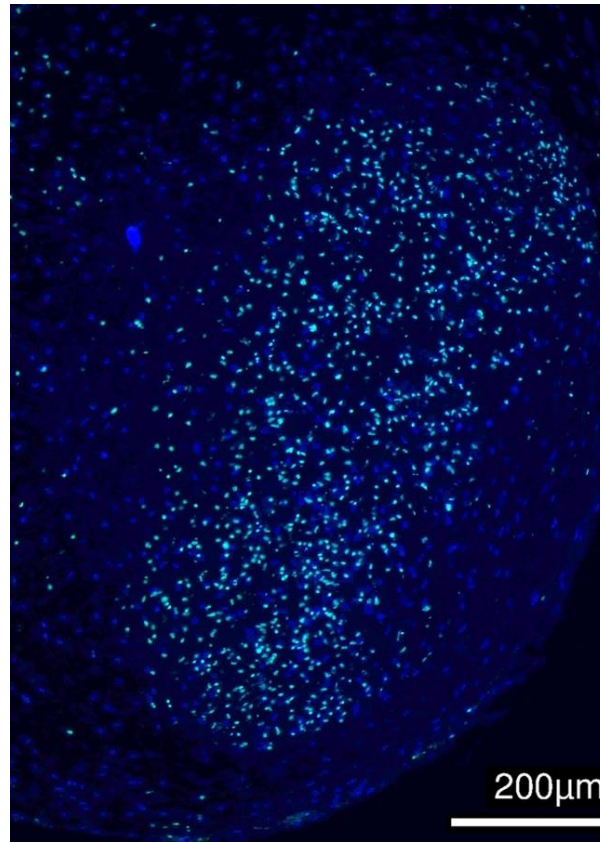


Abbildung 3-33: Aggregat d21, Kontrolle, Caspase, 10x, LN 798

3.6 Kollagen-II-Gehalt und DNA-Gehalt im ELISA

Die Aggregate wurden nur an Tag 7 mit Lokalanästhetika behandelt und anschließend für 21 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die quantitative Kollagen-II-Analyse mit Hilfe des Chondrex Type II Collagen Detection Kit und die quantitative DNA-Analyse mittels des Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Kit. Es sollte damit der Einfluss von Lokalanästhetika auf das Chondrogenesepotential mesenchymaler Stammzellen untersucht werden.

In den Aggregaten der Kontrollgruppe war an Tag 7 kein Kollagen-II nachweisbar. An Tag 14 lag der Kollagen-II-Gehalt der Aggregate bei $0,30 \pm 0,37 \mu\text{g}$ pro $1 \mu\text{g}$ DNA. Bis Tag 21 war der Kollagen-II-Gehalt der Kontrollaggregate auf $4,4 \pm 1,7 \mu\text{g}$ pro $1 \mu\text{g}$ DNA gestiegen ($p = 0,004$; Dunnett). Während die Behandlung mit Lokalanästhetika keine signifikanten Veränderungen im DNA-Gehalt herbeiführte, senkte sie den Kollagen-II-Gehalt signifikant ($p = 0,004$; ANOVA). Im Vergleich zur Kontrolle senkte Bupivacain den Gehalt an Kollagen-II auf $80 \pm 10 \%$ ($p = 0,004$; Dunnett), Ropivacain senkte ihn auf $64 \pm 19 \%$ ($p = 0,001$; Dunnett) und Mepivacain auf $68 \pm 16 \%$ ($p = 0,003$; Dunnett). Zwischen den einzelnen Lokalanästhetika zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In den folgenden Abbildungen werden die Effekte von 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain und 2 % Mepivacain auf den DNA-Gehalt (siehe Abb. 3-34) und den Kollagen-II-Gehalt (siehe Abb. 3-35) dargestellt. Die Aggregate wurden an Tag 7 für 1 Stunde den einzelnen Lokalanästhetika ausgesetzt und bis Tag 21 weiterkultiviert. Während sich der DNA-Gehalt durch die Behandlung mit Lokalanästhetika nicht veränderte, konnte ein signifikanter Rückgang des Kollagen-II-Gehalts beobachtet werden. Zwischen den einzelnen Substanzen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

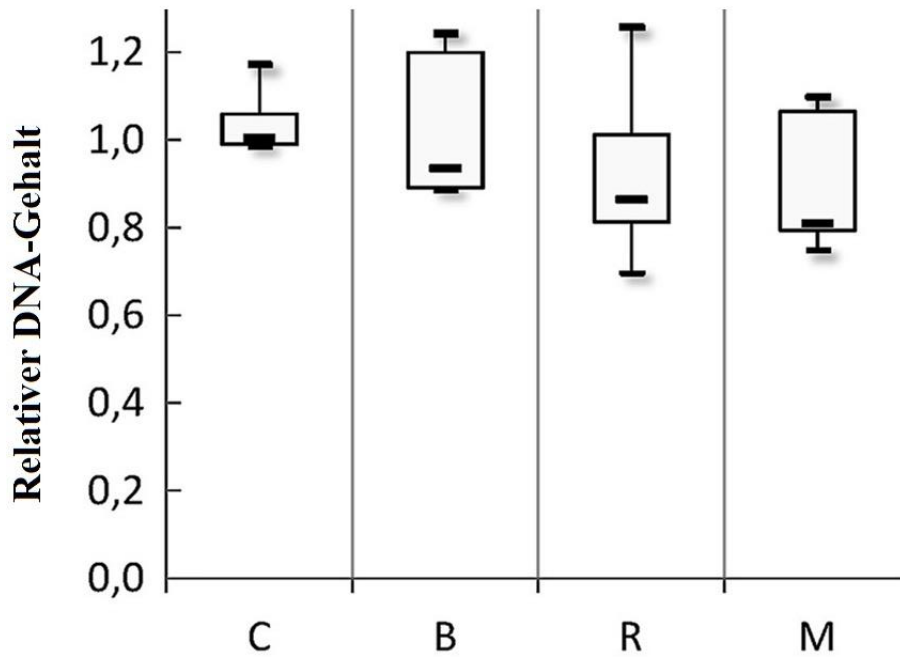


Abbildung 3-34: Auswirkungen einer Behandlung mit 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain bzw. 2 % Mepivacain auf den DNA-Gehalt der Aggregate. Die Werte auf der Skala entsprechen dem relativen DNA-Gehalt der belasteten Aggregate im Vergleich zum DNA-Gehalt der Kontrollaggregate. Die Daten werden als Boxplot dargestellt, wobei die Boxen dem Bereich entsprechen, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Die horizontalen Linien außerhalb der Boxen repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte aus neun Experimentreihen. C = Kontrolle, B = Bupivacain, R = Ropivacain, M = Mepivacain. # $p < 0,05$. * $p < 0,01$.

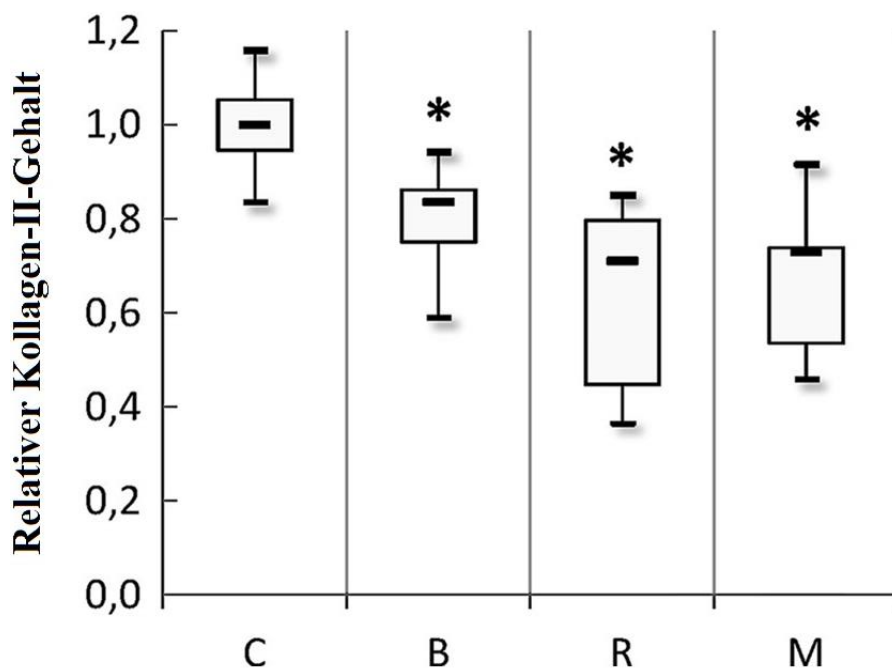


Abbildung 3-35: Auswirkungen von 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain bzw. 2 % Mepivacain auf den Kollagen-II-Gehalt der Aggregate. Die Werte auf der Skala entsprechen dem relativen Kollagen-II-Gehalt der belasteten Aggregate im Vergleich zum Kollagen-II-Gehalt der Kontrollaggregate. Die Daten werden als Boxplot dargestellt, wobei die Boxen dem Bereich entsprechen, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Die horizontalen Linien außerhalb der Boxen repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte aus neun Experimentreihen. C = Kontrolle, B = Bupivacain, R = Ropivacain, M = Mepivacain. # $p < 0,05$. * $p < 0,01$.

4 Diskussion

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Nekrose und Apoptose mesenchymaler Stammzellen nach Lokalanästhetika-Behandlung durch die Produktion von Knorpelgewebe während der Chondrogenese verringert werden konnte. Die Todesraten mesenchymaler Stammzellen in gut differenzierten Aggregaten waren vergleichbar mit denen der Kontrolle. Die Behandlung mit Lokalanästhetika beeinträchtigte *in vitro* die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.

4.1 Zusammenhang zwischen mesenchymalen Stammzellen, Lokalanästhetika und Tissue Engineering

Knorpelschäden betreffen viele Patienten in der orthopädischen Medizin und werden sich aufgrund des demographischen Wandels in den nächsten Jahren weiter häufen [6,82]. Sie entstehen durch Traumata oder degenerative Veränderungen und können im Laufe der Zeit in einer Arthrose resultieren. Aufgrund seiner fehlenden Fähigkeit zur Selbstregeneration stellt Knorpelgewebe die heutige Medizin vor die Herausforderung, geeignete Behandlungsmethoden für geschädigten Gelenkknorpel zu finden [83]. Durch eine frühe Diagnose und adäquate Rekonstruktion sollten Knorpelschäden lokal repariert werden, um das Fortschreiten zu einer Arthrose zu verhindern [84].

Eine vielversprechende Option zur Behandlung von geschädigtem Knorpelgewebe stellt das Tissue Engineering dar, bei dem mit Hilfe von Zellen, einer geeigneten Matrix und Wachstumsfaktoren *in vitro* Ersatzgewebe gezüchtet und anschließend implantiert werden kann [85]. Chondrozyten, die bei der ACT als Zellquelle verwendet werden, haben ein begrenztes Proliferationspotential und sind nur durch eine Biopsie aus gesundem Knorpelgewebe zu gewinnen [86]. Als alternative Zellquelle für das orthopädische Tissue Engineering bieten sich mesenchymale Stammzellen an. Mit ihnen konnten in den letzten Jahren bereits erste Erfolge bei der Reparatur von geschädigtem Gelenkknorpel erzielt werden [49,51,52,87–90].

Lokalanästhetika finden als kostengünstige und effektive Medikamente in der orthopädischen Chirurgie ubiquitäre Verwendung [91]. Trotz ihrer Effektivität in der Behandlung von perioperativen Schmerzen haben zahlreiche Studien in den letzten Jahren bewiesen, dass Lokalanästhetika zytotoxische Effekte auf Chondrozyten [55,58,59,61–64,66,92] und auch auf mesenchymale Stammzellen [68–71] haben.

Breu et al. [67] setzten in einem identischen experimentellen Setting mesenchymale Stammzellen in Einzelschichtkulturen und Aggregate mit mesenchymalen Stammzellen nach der Chondrogenese verschiedenen Konzentrationen von Lokalanästhetika aus und bestimmten deren Zytotoxizität zu bestimmten Zeitpunkten. Dabei schienen mesenchymale Stammzellen in Einzelschichtkulturen noch empfindlicher auf die Zytotoxizität der Lokalanästhetika zu reagieren als Chondrozyten. Im Gegensatz dazu waren die Vitalitätsraten von MSCs, die nach der Chondrogenese in Knorpelgewebe eingebettet waren, durch die Behandlung mit Lokalanästhetika nicht beeinflusst. In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe hatten Lokalanästhetika in geschädigtem Knorpel eine erhöhte Chondrotoxizität im Vergleich zu intaktem Knorpel [64].

Daraus ergaben sich zwei bisher ungeklärte Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollten: Kann die extrazelluläre Matrix die Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen beeinflussen? Haben Lokalanästhetika auch negative Effekte auf das Chondrogenesepotential von mesenchymalen Stammzellen?

4.2 Spezielle methodische Aspekte

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden aus Knochenmark mesenchymale Stammzellen gewonnen, aus denen Aggregate nach dem bewährten dreidimensionalen Chondrogenesemodell hergestellt wurden [41]. Dabei entstanden im Laufe der Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen Proben mit unterschiedlichem Gehalt an Proteoglycan und Kollagen, die es ermöglichten, die Rolle der Extrazellulärmatrix bei der Zytotoxizität der Lokalanästhetika zu untersuchen. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Aggregate äquipotenten Konzentrationen von Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain

ausgesetzt und anschließend nach 24 bzw. 96 Stunden histologisch und immunhistochemisch analysiert. Mittels Live-Dead- und Caspase-Staining wurden Apoptose- und Nekroseraten bestimmt. Außerdem wurden die Aggregate an Tag 7 für eine Stunde den genannten Lokalanästhetika ausgesetzt und anschließend bis Tag 21 unter chondrogenen Bedingungen kultiviert, um die Auswirkung von Lokalanästhetika auf das Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen mit Hilfe von immunhistologischen und biochemischen Methoden zu untersuchen.

Die Proliferations- und Regenerationsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen nimmt mit steigendem Alter deutlich ab [93]. Daher wurden für diese Studie ausschließlich junge Spender im Alter von 19 bis 29 Jahren ausgewählt, um Zellen mit optimalem chondrogenen Potential für die Experimente zu gewinnen.

Die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen hängt unter anderem auch vom Östrogenlevel in der Umgebung ab [94,95]. Da der Östrogenspiegel bei Männern weitgehend konstant ist und nicht zyklusabhängigen Schwankungen unterliegt [96], wurden die Zellen für diese Studie ausschließlich von männlichen Spendern gewonnen, um konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Um mögliche Korrelationen zwischen den spezifischen zytotoxischen Effekten und der analgetischen Potenz der Lokalanästhetika beurteilen zu können, wurden äquipotente Konzentrationen der drei verwendeten Pipicoloxylidid-Anästhetika verwendet [97]. Es wurden dabei wie in vorhergehenden Studien zu diesem Thema die im klinischen Alltag üblichen Konzentrationen verwendet (0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain, 2 % Mepivacain), um eine hohe klinische Relevanz sowie eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten [57,64,67,70,98].

Die Pharmakokinetik im Rahmen von intraartikulärer Lokalanästhetika-Gabe ist bis heute nicht vollkommen geklärt. Die Absorption von Bupivacain in großen Gelenken scheint in der ersten Stunde nach Verabreichung stattzufinden [99–101]. Daher schien für diese Studie eine Behandlungsdauer mit Lokalanästhetika für eine Stunde eine klinisch relevante und sinnvolle Expositionszeit zu sein.

Frühere Studien an Chondrozyten hatten gezeigt, dass die Nekrose und Apoptose von Chondrozyten zeitabhängig stattfindet [65,102,103]. Dies scheint auch auf mesenchymale Stammzellen zuzutreffen [67], sodass die Bestimmung der Vitalitätsraten zu verschiedenen Zeitpunkten, nämlich nach 24 und nach 96 Stunden, durchgeführt wurde. Andernfalls hätten toxische Effekte eventuell versäumt werden können.

Aggregate, die für eine Stunde mit reinem Natriumchlorid behandelt worden waren, zeigten gleich niedrige Apoptose- und Nekroseraten wie Aggregate, die durchgehend in Nährmedium belassen worden waren. So konnte ausgeschlossen werden, dass nicht fälschlicherweise zytotoxische Effekte von Natriumchlorid auf Lokalanästhetika zurückgeführt wurden.

4.3 Abhängigkeit der Zytotoxizität der Lokalanästhetika von Volumen und Struktur der extrazellulären Matrix

In der Studie von Breu et al. [67] zeigten Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain konzentrations- und zeitabhängig schädliche zytotoxische Effekte auf humane mesenchymale Stammzellen in Monolayer-Kulturen. Bupivacain 0,5 % bewirkte eine Reduktion der vitalen mesenchymalen Stammzellen auf 5 %. Nach der Behandlung mit 0,75 % Ropivacain wurden 16 % vitale Zellen gefunden. Eine Belastung mit 2 % Mepivacain reduzierte die Vitalitätsraten auf 1 %. Ropivacain war signifikant weniger zytotoxisch als Bupivacain und Mepivacain. Die Vitalitätsraten von mesenchymalen Stammzellen, die nach der Chondrogenese in Knorpelgewebe eingebettet waren, wurden durch die Behandlung mit Lokalanästhetika nicht beeinflusst.

Daraus ergab sich die erste zu überprüfende Hypothese, nämlich dass die Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen vom Volumen und der Struktur der extrazellulären Matrix der Aggregate abhängig ist. Diese Hypothese konnte in den vorliegenden Experimenten bestätigt werden:

Während der Chondrogenese bildete sich um die MSCs knorpelspezifische Extrazellulärmatrix von variierender Menge und Struktur. Die histologischen, immunhistologischen und

biochemischen Analysen zeigten in den Aggregaten kontinuierlich steigende Mengen an Knorpel-spezifischen Proteinen während der fortlaufenden Chondrogenese. Sowohl der Gehalt von Kollagen-I und Kollagen-II in der Immunhistochemie als auch der Gehalt von sulfatierten Glucosaminoglykanen in der DMMB-Färbung nahm von Tag 7 bis Tag 21 fortwährend zu. Dies sind typische Marker für die Ausbildung hyalinen Knorpels [104,105].

Nach einer Lokalanästhetika-Behandlung an Tag 7 wurden die mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zur Kontrolle in den oberflächlichen Schichten der Aggregate zunehmend nekrotisch und apoptotisch. Die Nekrose- und Apoptoseraten waren an den Randbereichen der Aggregate erhöht und erreichten ihr Maximum vier Tage nach Belastung. 96 Stunden nach Belastung lagen die Nekroseraten an Tag 7 bei 13 -15 %, in der Kontrolle dagegen lediglich bei 4,5 %. An Tag 14 verkleinerte sich der Bereich mit nekrotischen und apoptotischen mesenchymalen Stammzellen. 96 Stunden nach Belastung an Tag 14 lagen die Nekroseraten bei 11 - 17 %, in der Kontrolle bei 4,7 %. Dagegen war die Vitalität der mesenchymalen Stammzellen in gut differenzierten Aggregaten an Tag 21 kaum reduziert. Die Nekroseraten betragen noch 8 – 9 %. Zusammengefasst nahm die Zytotoxizität der Lokalanästhetika mit zunehmender Differenzierung, Qualität und Quantität der Extrazellulärmatrix ab. Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain zeigten keine Unterschiede in ihrer Zytotoxizität auf die Aggregate.

Im Vergleich zu Einzelschichtkulturen [67] waren die Nekrose- und Apoptoseraten mesenchymaler Stammzellen in den Aggregaten deutlich geringer. Die Breite der oberflächlichen Zone, in der Zellen abstarben, nahm mit zunehmender Differenzierung ab. Die Extrazellulärmatrix schützte die mesenchymalen Stammzellen offenbar vor der Zytotoxizität der Lokalanästhetika.

Lokalanästhetika diffundieren in das Gewebe [54]. Eine niedrigere Qualität oder Quantität der Extrazellulärmatrix, wie sie in unzureichend differenziertem Knorpelgewebe beim Tissue Engineering oder in degeneriertem Gelenknorpel vorkommt, erhöht wahrscheinlich die Diffusionskapazität der Moleküle, sodass die Lokalanästhetika ihre zytotoxischen Effekte in tieferen Schichten der Aggregate entfalten können [106].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Studien [64,67] wurden auch in dieser Arbeit die niedrigsten Vitalitätsraten 96 Stunden nach einer einstündigen Belastung gefunden.

Unmittelbarer Zelltod wurde in den Vorgängerarbeiten vor allem durch Nekrosen verursacht, gefolgt von Apoptosen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass auch im dreidimensionalen Kulturmodell den initialen Nekrosen eine apoptotische Phase folgte.

Rahnama et al. [69] führten 2013 ebenfalls eine Studie an mesenchymalen Stammzellen in Einzelschicht-Kultur mit einem ähnlichen experimentellen Setting durch: Dabei wurden humane mesenchymale Stammzellen von drei gesunden Spendern in Monolayer-Kultur vermehrt und für eine Stunde verschiedenen Konzentrationen von Bupivacain, Ropivacain und Lidocain ausgesetzt. Nach einem 24-stündigen Intervall wurde die Vitalität mittels Fluoreszenzstaining gemessen. Der Anzahl der lebenden Zellen belief sich dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 0,25 % Bupivacain auf 94 %, bei 0,5 % Bupivacain auf 79 %, bei 0,2 % Ropivacain auf 83 % und bei 0,5 % Ropivacain auf 84 %. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigten Bupivacain und Ropivacain also ebenfalls zytotoxische Effekte auf mesenchymale Stammzellen, jedoch waren diese im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lidocain nicht signifikant. Bei Lidocain 1 % lag die Rate an vitalen Zellen bei 49%, bei Lidocain 2 % bei 32 %. Rahnama et al. bestimmten die Zellvitalität jedoch lediglich nach 24 Stunden und nicht nach 96 Stunden, was eventuell dazu geführt haben könnte, dass der Zeitpunkt der größten Zytotoxizität zum Zeitpunkt der Messung noch gar nicht erreicht war.

In früheren Studien war Bupivacain im Vergleich zu anderen Lokalanästhetika sowohl auf Chondrozyten als auch auf mesenchymale Stammzellen oft besonders toxisch, während Ropivacain im Vergleich zu anderen Substanzen eine eher geringere Toxizität aufwies [64,65,67,107]. Im Gegensatz dazu zeigten sich in der vorliegenden Arbeit in den Aggregaten keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen den einzelnen Lokalanästhetika. Das Molekulargewicht und die Lipophilität von Pipecoloxylidid-Lokalanästhetika nehmen von Mepivacain über Ropivacain zu Bupivacain zu [97,108–111]. Auf Grund des hydrophilen Charakters der Knorpel-ähnlichen Extrazellulärmatrix sollte die Diffusionskapazität von Mepivacain über Ropivacain zu Bupivacain abnehmen. Deshalb regulieren die Extrazellulärmatrix und ihre Diffusionseigenschaften offenbar die Gewebekonzentrationen zugunsten kleinerer und weniger toxischer Lokalanästhetika. Dadurch werden vor allem in Extrazellulärmatrix eingebettete Zellen vor den toxischeren Substanzen geschützt.

Auch in einer Arbeit von Rahnama et al. [69] ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität von Ropivacain und Bupivacain. Die beobachteten Unterschiede könnten entweder daher kommen, dass Lokalanästhetika unterschiedliche Effekte auf Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen haben. Weiter liegt die Vermutung nahe, dass Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen, die von extrazellulärer Matrix umgeben sind, eine andere Wirkung haben als auf Chondrozyten oder Stammzellen in Monolayer-Kultur.

4.4 Einfluss von Lokalanästhetika auf das Chondrogenesepotential mesenchymaler Stammzellen

Lucchinetti et al. [68] demonstrierten, dass Lokalanästhetika negative Effekte auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen von Mäusen haben. Sie untersuchten in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von Lidocain, Ropivacain und Bupivacain die Proliferation und Differenzierung von in Kultur vermehrten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen. Dabei führten alle drei Lokalanästhetika zu einer reduzierten Proliferation der Stammzellen. Die Koloniebildung war vermindert, die Differenzierung beeinträchtigt und die *in-vitro*-Wundheilung verspätet. Während Lucchinetti et al. so den negativen Einfluss von Lidocain, Ropivacain und Bupivacain auf murine Stammzellen nachgewiesen hatten, waren die Effekte von Lokalanästhetika auf die Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen in früheren Studien noch nicht bestimmt worden.

Wie bereits von Rahnama et al. [69] vorgeschlagen, sollte in dieser Arbeit nun zum ersten Mal der Einfluss von Lokalanästhetika auf das Chondrogenesepotential humaner mesenchymaler Stammzellen untersucht werden. Die Hypothese, dass die Behandlung mit Lokalanästhetika einen negativen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen hat, ließ sich anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigen:

Um den Einfluss der Lokalanästhetika auf die Chondrogenese zu untersuchen, wurden die Aggregate an Tag 7 belastet, unter chondrogenen Bedingungen weiter kultiviert und an Tag 21 auf ihren Kollagen-II-Gehalt untersucht. Um die einzelnen Versuchsgruppen bezüglich ihres

chondrogenen Potentials untereinander vergleichen zu können, wurden die Kollagen-II-Werte anschließend in Bezug zur DNA gesetzt.

In den Aggregaten der Kontrollgruppe war an Tag 7 kein Kollagen-II nachweisbar. An Tag 14 konnten bereits größere Mengen an Kollagen-II in den Aggregaten nachgewiesen werden. Bis Tag 21 war der Kollagen-II-Gehalt der Kontrollaggregate signifikant weiter angestiegen.

Aggregate, die an Tag 7 mit Lokalanästhetika behandelt worden waren, zeigten an Tag 21 im Vergleich zur Kontrolle eine reduzierte Menge an Kollagen-II: Bupivacain senkte den Gehalt an Kollagen-II um $80 \pm 10 \%$, Ropivacain senkte ihn um $64 \pm 19 \%$ und Mepivacain um $68 \pm 16 \%$. Dies könnte an einer durch die Lokalanästhetika verursachten reduzierten Synthese- und Differenzierungsfähigkeit der mesenchymalen Stammzellen liegen. Der verringerte Kollagen-II-Gehalt könnte auch Folge einer verringerten absoluten Anzahl an synthetisierenden Zellen infolge der Zytotoxizität der Lokalanästhetika sein. Vitalitätssanalysen, die 96 Stunden nach der Behandlung der Aggregate an Tag 7 durchgeführt wurden, zeigten 13 – 15 % toter Zellen in den behandelten Gruppen im Vergleich zu 4,5 % in den Kontrollen. An Tag 21 waren die Mengen an DNA in behandelten wie in unbehandelten Gruppen nicht signifikant reduziert, was für eine Angleichung der Zellzahlen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten spricht. Dies könnte entweder durch Zellproliferation oder durch Apoptose und Nekrose der mesenchymalen Stammzellen erklärt werden. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass vor allem in dichter besiedelten Bereichen mesenchymale Stammzellen apoptotisch werden. Außerdem könnte der auf die Zellnekrosen folgende DNA-Zerfall verspätet stattfinden.

4.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit hatte einige Limitationen. Sie wurde mit den Stammzellen einer kleinen Anzahl von Spendern durchgeführt. Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit *in vitro* in einem streng definierten Nährmedium entstanden sind, ist nicht klar, ob Lokalanästhetika unter den vielfältigen biochemischen Einflüssen *in vivo* dieselben Effekte auf mesenchymale

Stammzellen während der Chondrogenese haben. Außerdem kann es möglicherweise während der Experimente zu unbeabsichtigter iatrogenen Zellschädigung gekommen sein.

Die Experimente wurden mit mesenchymalen Stammzellen junger Patienten durchgeführt. Möglicherweise zeigen Stammzellen älterer Patienten unter Lokalanästhetika-Exposition ein abweichendes Verhalten. Wenn Tissue-Engineering-Verfahren in Zukunft an älteren Patienten durchgeführt werden sollen, sollten eventuelle Unterschiede des chondrogenen Potentials zwischen den mesenchymalen Stammzellen junger und alter Patienten näher untersucht werden.

Diese Studie wurde konzipiert, um die Effekte von Lokalanästhetika während der Chondrogenese zu untersuchen und liefert keine Informationen über die Mechanismen, die für die Zytotoxizität der Lokalanästhetika verantwortlich sind.

Die anfängliche Euphorie bezüglich des Einsatzes von mesenchymalen Stammzellen im Tissue Engineering ist mittlerweile einer rationaleren Betrachtung gewichen. Es hat sich herausgestellt, dass mesenchymale Stammzellen im Chondrogenese-Modell dazu neigen zu hypertrophieren [112,113]. Nach einer gewissen Anzahl von Teilungen neigen mesenchymale Stammzellen dazu, in ein Stadium der Seneszenz überzugehen [114,115]. Die Chondrogenese hält nicht bei der Ausbildung von hyalinem Knorpel an, sondern schreitet in das Stadium der enchondralen Ossifikation fort, wie sie bei der Entwicklung des Skeletts beobachtet wird. Bei *in-vivo*-Experimenten mit Knorpelkonstrukten aus mesenchymalen Stammzellen kommt es zur Dedifferenzierung, Vaskularisierung und Mineralisierung [116,117]. Bei der Anwendung von mesenchymalen Stammzellen zur Reparatur von Knorpelschäden am Menschen müssen daher die Kultivierungs- und Differenzierungsabläufe weiter verbessert werden, um optimale Resultate erzielen zu können.

Trotz ihrer Einschränkungen ist diese Arbeit von entscheidender Bedeutung, da sie die erste Studie überhaupt zum Einfluss von Lokalanästhetika auf die Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen darstellt.

4.6 Ausblick

Über die möglichen Mechanismen, die zur Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen führen, ist bisher wenig bekannt. Lucchinetti et al. [68] brachten die reduzierte Proliferationsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen nach Lokalanästhetika-Behandlung mit einem verlangsamten Zellzyklus und einem Arrest in der G0- bzw. G1-Phase in Verbindung. Laut Lucchinetti et al. reduziert Ropivacain die TGF- α -induzierte Expression von ICAM-1, einem wichtigen Oberflächen-Rezeptor bei der Migration und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Transkriptionale Vorgänge, die mit der Zelldifferenzierung zusammenhängen, sowie die mitochondriale Atmung wurden von Ropivacain negativ beeinflusst.

Dregalla et al. [70] stellten die Theorie auf, dass während der Lokalanästhetika-Exposition die intrazellulären Calcium-Speicher freigegeben werden, was zur Induktion der Apoptose in mesenchymalen Stammzellen führen könnte [118,119]. Möglicherweise interagiert Bupivacain mit Natrium-Kalium-ATPasen in der Membran der mesenchymalen Stammzellen, was die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum mittels Interaktion mit dem Inositol-Triphosphat-Rezeptor triggern könnte [120–122].

Angesichts dieser sehr unterschiedlichen Erklärungsansätze wird klar, dass weitere Studien benötigt werden, um die Mechanismen, die der Zytotoxizität der Lokalanästhetika zugrunde liegen, aufzuklären.

Unabhängig von der Belastung mit Lokalanästhetika fielen in dieser Arbeit gehäuft apoptotische Zellen in Bereichen mit erhöhter Zelldichte auf. Es empfiehlt sich daher für die Zukunft, bei der Anwendung MSC-basierter Tissue-Engineering-Verfahren darauf zu achten, geeignete Scaffolds auszuwählen, bei denen die sich differenzierenden Zellen einen ausreichenden Abstand zueinander haben, um erhöhte Apoptoseraten zu verhindern.

Diese Arbeit war eine *in-vitro*-Studie. In Zukunft sollten weitere Experimente über die Auswirkungen von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen *in vivo* durchgeführt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Quantität und Qualität der extrazellulären Matrix erheblichen Einfluss auf die Zytotoxizität von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen hat. Dies ist von erheblicher klinischer Relevanz, da Lokalanästhetika vor allem zum Schmerzmanagement in arthrotischen, verletzten oder operierten Gelenken verwendet werden, wo von einer verminderten oder geschädigten extrazellulären Matrix auszugehen ist. Außerdem spielen mesenchymale Stammzellen bei Heilungsvorgängen von Bindegewebe im Allgemeinen eine wichtige Rolle [123], sodass der intraartikuläre Einsatz von Lokalanästhetika nicht nur im Rahmen von Tissue-Engineering-Verfahren, sondern generell kritisch gesehen werden sollte.

Angesichts des in dieser Arbeit bewiesenen Einflusses von Lokalanästhetika auf mesenchymale Stammzellen während der Chondrogenese sollte über alternative Möglichkeiten des Schmerzmanagements im Rahmen von orthopädischen Eingriffen und Tissue Engineering nachgedacht werden. Eine Möglichkeit könnte die intraartikuläre Verabreichung von Morphin und seinen Derivaten sein [124–126]. Laut einer Studie von Haasters et al. [98] beeinflusst Morphin das Zellüberleben, die Apoptose und den Metabolismus zumindest bei humanen Sehnen-Stammzellen im Gegensatz zu Bupivacain und Ropivacain nicht. Unter der Annahme, dass Morphin eine vergleichbare bis sogar verlängerte Schmerzreduktion nach vorderer Kreuzbandplastik bietet [127], schlägt Haasters daher Morphin als ein eventuell weniger toxisches Analgetikum für die intraartikuläre Applikation in der klinischen Praxis vor.

Falls die intraartikuläre Gabe von Lokalanästhetika jedoch unumgänglich erscheint, sollte angesichts der aktuellen Forschungsergebnisse die jeweilige Substanz mit Bedacht gewählt werden. Derzeit scheint Ropivacain dabei noch das geeignetste Mittel zu sein, da es sich zumindest in einem Teil der Studien als weniger toxisch auf Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen erwiesen hat als Mepivacain, Bupivacain oder Lidocain [55,64,65,67,69,70]. Bei Verwendung von Lokalanästhetika im Rahmen von MSC-basierten Tissue-Engineering-Verfahren ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich die Verwendung gut differenzierter Transplantate mit ausreichend extrazellulärer Matrix zu bevorzugen.

5 Zusammenfassung

Knorpelschäden stellen eine Herausforderung für die orthopädische Chirurgie dar, was vor allem an der begrenzten intrinsischen Regenerationsfähigkeit von hyalinem Knorpelgewebe liegt. Unbehandelte Defekte gehen oft in eine sekundäre Arthrose über. So ist es von großer Bedeutung, Knorpelschäden frühzeitig zu behandeln, bevor es zur Ausbildung einer Arthrose kommt. Ein neuer vielversprechender Ansatz zur Therapie von Knorpelläsionen ist das Tissue Engineering. Aufgrund ihrer guten Vermehrungs- und Differenzierungseigenschaften und ihrer einfachen Verfügbarkeit bieten sich mesenchymale Stammzellen als Zellquelle für das Tissue Engineering im Bereich der Knorpelreparatur an.

In der orthopädischen Chirurgie werden im Rahmen von arthroskopischen Eingriffen Lokalanästhetika als effiziente, kostengünstige und gut tolerierte Präparate vielfach verwendet. Daher ist die Frage, ob Lokalanästhetika im Rahmen von MSC-basierten Tissue-Engineering-Verfahren angewendet werden können, von großer klinischer Relevanz. Studien in den letzten Jahren zeigten, dass Lokalanästhetika zytotoxische Effekte auf Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen haben. Dabei war die toxische Wirkung bei arthrotischem Knorpel stärker als bei intaktem Knorpel. Außerdem wirkten Lokalanästhetika schädlich auf mesenchymale Stammzellen in Monolayer-Kultur, hatten aber keinen Einfluss auf mesenchymale Stammzellen nach vollzogener Chondrogenese. Daraus ergibt sich, dass die extrazelluläre Matrix die Zytotoxizität von Lokalanästhetika beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine Kurzzeitbehandlung mit Bupivacain, Mepivacain oder Ropivacain auf die Vitalität von humanen mesenchymalen Stammzellen auswirkt, die von Extrazellulärmatrix mit variierendem Volumen und Struktur umgeben sind. Außerdem sollten mögliche Effekte von Lokalanästhetika auf das Chondrogenesepotential mesenchymaler Stammzellen untersucht werden.

Die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen *in vitro* lieferte Gewebeproben mit zunehmendem Gehalt an knorpelspezifischer extrazellulärer Matrix, wodurch systematisch untersucht werden konnte, welche Rolle die extrazelluläre Matrix bei der Zytotoxizität von Lokalanästhetika spielt. . Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Aggregate histologisch und immunhistochemisch analysiert und äquipotenten Konzentrationen von Bupivacain,

Ropivacain und Mepivacain ausgesetzt. Mittels Live-Dead- und Caspase-Staining wurden die Zellvitalität sowie Apoptose- und Nekroseraten 24 bzw. 96 Stunden nach Behandlung bestimmt. Außerdem wurden die Aggregate an Tag 7 für eine Stunde den genannten Lokalanästhetika ausgesetzt und anschließend bis Tag 21 unter chondrogenen Bedingungen kultiviert, um die Auswirkung von Lokalanästhetika auf das Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen.

Die Behandlung mit Lokalanästhetika führte dazu, dass die mesenchymalen Stammzellen in den oberflächlichen Schichten unzureichend differenzierter Aggregate in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nekrotisch und apoptotisch wurden. In gut differenzierten Aggregaten dagegen war die Zellvitalität nicht verringert. Je länger die Dauer der Chondrogenese, desto schmaler wurde die oberflächliche Zone der Aggregate, die geschädigte mesenchymale Stammzellen enthielt. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität von Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain. Diese Resultate zeigen, dass das Ausmaß der Zytotoxizität der Lokalanästhetika deutlich von der Qualität und der Quantität der extrazellulären Matrix beeinflusst wird. Außerdem konnte festgestellt werden, dass Lokalanästhetika die Ausbildung der Knorpelmatrix durch mesenchymale Stammzellen negativ beeinflussen. Deshalb sollte ein induzierter Zellschaden durch Lokalanästhetika während der Chondrogenese vermieden werden.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AM	Acetoxymethylester
BSA	Bovines Serumalbumin
d	Tag
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DGOU	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
FCS	Fetales Kälberserum
Hepes	N-2-Hydroxyethyl Piperazine-N'-2-Ethan Sulfonic Acid
IgG	Immunglobulin Gamma
ITS-3	Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite+3-Solution
LA	Lokalanästhetika
LN	Labornummer
M	Molar
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MV	Mittelwert
n	Anzahl
OPD	o-Phenylendiamin
PBS	Phosphate Buffered Saline
sGAG	Sulfatierte Glykosaminoglykane
Tab.	Tabelle

TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris/EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
U	Umdrehung
VF	Verdünnungsfaktor

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Intraoperatives Bild eines rechten Knies mit einem großen Knorpelschaden der seitlichen und zentralen Trochlea. Quelle: Gomoll, 2014 [12] 2

Abbildung 1-2: Prinzip des Tissue Engineering: Körpereigene Zellen werden isoliert, mit Hilfe von Wachstumsfaktoren kultiviert und auf ein Gerüst, das sog. Scaffold, aufgebracht. Das fertige Produkt wird dem Patienten anschließend transplantiert. Quelle: Dvir 2011 [28]. 5

Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Multipotenz bzw. Differenzierung mesenchymaler Stammzellen nach Caplan [39] 7

Abbildung 3-1: Aggregat d7, makroskopisch, 1,5x, LN 823..... 30

Abbildung 3-2: Aggregat d14, makroskopisch, 1,5x, LN 823..... 30

Abbildung 3-3: Aggregat d21, makroskopisch, 1,5x, LN 823..... 30

Abbildung 3-4: Aggregat d7, DMMB-Färbung, 4x, LN 823..... 32

Abbildung 3-5: Aggregat d14, DMMB-Färbung, 4x, LN 823..... 32

Abbildung 3-6: Aggregat d21, DMMB-Färbung, 4x, LN 823..... 32

Abbildung 3-7: Aggregat d7, Immunhistologie Kollagen I, 4x, LN 823..... 34

Abbildung 3-8: Aggregat d14, Immunhistologie Kollagen I, 4x, LN 823..... 34

Abbildung 3-9: Aggregat d21, Immunhistologie Kollagen I, 4x, LN 823..... 34

Abbildung 3-10: Aggregat d7, Immunhistologie Kollagen-II, 4x, LN 825 35

Abbildung 3-11: Aggregat d14, Immunhistologie Kollagen-II, 4x, LN 825	35
Abbildung 3-12: Aggregat d21, Immunhistologie Kollagen-II, 4x, LN 825	35
Abbildung 3-13: Aggregat d7, Bupivacain, Live/Dead, 10x, LN 798.....	37
Abbildung 3-14: Aggregat d7, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN 798.....	37
Abbildung 3-15: Aggregat d14, Bupivacain, Live/Dead, 10x, LN 798.....	37
Abbildung 3-16: Aggregat d14, Kontrolle Totaggregat, Live/Dead, 10x, LN 798	37
Abbildung 3-17: Aggregat d21, Bupivacain, Live/Dead, 10x, LN 798.....	37
Abbildung 3-18: Aggregat d21, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN 798	37
Abbildung 3-19: Aggregat d7, Ropivacain, Live/Dead, 10x, LN798.....	39
Abbildung 3-20: Aggregat d7, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN798	39
Abbildung 3-21: Aggregat d14, Ropivacain, Live/Dead, 10x, LN798.....	39
Abbildung 3-22: Aggregat d14, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN 798	39
Abbildung 3-23: Aggregat d21, Ropivacain, Live/Dead, 10x, LN798.....	39
Abbildung 3-24: Aggregat d21, Kontrolle, Live/Dead, 10x, LN798	39
Abbildung 3-25: Nekroseraten 24 und 96 Stunden nach einer einstündigen Belastung mit 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain bzw. 2 % Mepivacain zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Chondrogenese. Die Werte auf der Skala stellen den Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtzellzahl im Aggregat dar. Die Daten werden als Boxplot dargestellt, wobei die Boxen dem Bereich entsprechen, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Die horizontalen Linien außerhalb der Boxen repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte aus neun Experimentreihen. C = Kontrolle; B = Bupivacain; R = Ropivacain; M = Mepivacain. *p < 0,01.	40
Abbildung 3-26: Aggregat d7, Bupivacain, Caspase, 10x, LN 823	43

Abbildung 3-27: Aggregat d7, Kontrolle, Caspase, 10x, LN 823.....	43
Abbildung 3-28: Aggregat d14, Bupivacain, Caspase, 10x, LN 823	43
Abbildung 3-29: Aggregat d14, Kontrolle, Caspase, 10x, LN 823.....	43
Abbildung 3-30: Aggregat d21, Bupivacain, Caspase, 10x, LN 823	43
Abbildung 3-31: Aggregat d21, Kontrolle, Caspase, 10x, LN823.....	43
Abbildung 3-32: Aggregat d21, Kontrolle, Durchlicht, 10x, LN 798	44
Abbildung 3-33: Aggregat d21, Kontrolle, Caspase, 10x, LN 798.....	44
Abbildung 3-34: Auswirkungen einer Behandlung mit 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain bzw. 2 % Mepivacain auf den DNA-Gehalt der Aggregate. Die Werte auf der Skala entsprechen dem relativen DNA-Gehalt der belasteten Aggregate im Vergleich zum DNA-Gehalt der Kontrollaggregate. Die Daten werden als Boxplot dargestellt, wobei die Boxen dem Bereich entsprechen, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Die horizontalen Linien außerhalb der Boxen repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte aus neun Experimentreihen. C = Kontrolle, B = Bupivacain, R = Ropivacain, M = Mepivacain. #p<0,05. *p<0,01.....	46
Abbildung 3-35: Auswirkungen von 0,5 % Bupivacain, 0,75 % Ropivacain bzw. 2 % Mepivacain auf den Kollagen-II-Gehalt der Aggregate. Die Werte auf der Skala entsprechen dem relativen Kollagen-II-Gehalt der belasteten Aggregate im Vergleich zum Kollagen-II-Gehalt der Kontrollaggregate. Die Daten werden als Boxplot dargestellt, wobei die Boxen dem Bereich entsprechen, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Die horizontalen Linien außerhalb der Boxen repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte aus neun Experimentreihen. C = Kontrolle, B = Bupivacain, R = Ropivacain, M = Mepivacain. #p<0,05. *p<0,01.....	46

6.3 Literaturverzeichnis

1. Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. Chondral injuries. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(2):134–41. PubMed PMID: 11845018.
2. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003;81(9):646–56. PubMed PMID: 14710506.
3. Müller M. *Chirurgie: Für Studium und Praxis - 2016/17*. 13th ed. Breisach: Medizinische Vlg- u. Inform.-Dienste; 2015. 544 S.
4. Statistisches Bundesamt. *Krankheitskostenbericht*. Wiesbaden; 2008.
5. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(1):3–25. doi: 10.1016/j.berh.2005.09.007. PubMed PMID: 16483904.
6. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013;39(1):1–19. doi: 10.1016/j.rdc.2012.10.004. PubMed PMID: 23312408.
7. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care*. 2009;15(8 Suppl):S230-5. PubMed PMID: 19817509.
8. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res*. 1995(317):3–6. PubMed PMID: 7671493.
9. Hayes DW, JR, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg*. 2001;18(1):35–53. PubMed PMID: 11344979.
10. Mollenhauer J, Kuettner KE. Articular Cartilage. In: Deery, Hurst LC, Gruber MA, Stephen A, editors. *Principles of Orthopaedic Practice*. 2nd ed. New York: McGrawHill; 1997.
11. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(3):423–35. doi: 10.1007/s00167-011-1818-0. PubMed PMID: 22173730.

12. Gomoll AH, Minas T. The quality of healing: articular cartilage. *Wound Repair Regen.* 2014;22 Suppl 1:30–8. doi: 10.1111/wrr.12166. PubMed PMID: 24813362.
13. Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(12):1824–33. doi: 10.1016/j.joca.2013.08.024. PubMed PMID: 24018339.
14. Lutzner J, Kasten P, Gunther K-P, Kirschner S. Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(6):309–16. doi: 10.1038/nrrheum.2009.88. PubMed PMID: 19491912.
15. Dewan AK, Gibson MA, Elisseeff JH, Trice ME. Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed Res Int.* 2014;2014:272481. doi: 10.1155/2014/272481. PubMed PMID: 25210707.
16. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001(391 Suppl):S362-9. PubMed PMID: 11603719.
17. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *The Journal of bone and joint Surgery.* 1959.
18. Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M, et al. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: a guideline by the working group "Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology (DGOU). *Z Orthop Unfall.* 2013;151(1):38–47. doi: 10.1055/s-0032-1328207. PubMed PMID: 23423589.
19. Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg.* 2011;77(6):709–26. PubMed PMID: 22308614.
20. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med.* 2009;37(10):2053–63. doi: 10.1177/0363546508328414. PubMed PMID: 19251676.

21. Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A Suppl 1:65–72. PubMed PMID: 14996923.
22. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A(2):185–92. PubMed PMID: 12571292.
23. Skalak R, Fox F. Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988. New York: Alan Liss; 1988.
24. Tatara AM, Mikos AG. Tissue Engineering in Orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(13):1132–9. doi: 10.2106/JBJS.16.00299. PubMed PMID: 27385687.
25. Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp.* 2003;249:175-86; discussion 186-9, 234-8, 239-41. PubMed PMID: 12708656.
26. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy.* 2007;23(4):381–7. doi: 10.1016/j.arthro.2006.12.003. PubMed PMID: 17418330.
27. Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1259–71. doi: 10.1177/0363546509346395. PubMed PMID: 19966108.
28. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol.* 2011;6(1):13–22. doi: 10.1038/nnano.2010.246. PubMed PMID: 21151110.
29. Saris DBF, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, et al. Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic

- cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med.* 2008;36(2):235–46. doi: 10.1177/0363546507311095. PubMed PMID: 18202295.
30. Basad E, Ishaque B, Bachmann G, Sturz H, Steinmeyer J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):519–27. doi: 10.1007/s00167-009-1028-1. PubMed PMID: 20062969.
31. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1117–24. doi: 10.1177/0363546509357915. PubMed PMID: 20181804.
32. Beris AE, Lykissas MG, Kostas-Agnantis I, Manoudis GN. Treatment of full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation: a functional evaluation with long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 2012;40(3):562–7. doi: 10.1177/0363546511428778. PubMed PMID: 22138109.
33. Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging technique. *Am J Sports Med.* 2010;38(5):943–9. doi: 10.1177/0363546509358266. PubMed PMID: 20185841.
34. Deng Z, Jin J, Zhao J, Xu H. Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9201492. doi: 10.1155/2016/9201492. PubMed PMID: 26839570.
35. Bauge C, Boumediene K. Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments. *Stem Cells Int.* 2015;2015:438026. doi: 10.1155/2015/438026. PubMed PMID: 26246809.

36. Bauge C, Duval E, Ollitrault D, Girard N, Leclercq S, Galera P, et al. Type II TGFbeta receptor modulates chondrocyte phenotype. *Age (Dordr)*. 2013;35(4):1105–16. doi: 10.1007/s11357-012-9433-7. PubMed PMID: 22653295.
37. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S58-65. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.038. PubMed PMID: 18313473.
38. Nazempour A, van Wie BJ. Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(5):1325–54. doi: 10.1007/s10439-016-1575-9. PubMed PMID: 26987846.
39. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994;21(3):429–35. PubMed PMID: 7924141.
40. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076–84. doi: 10.1002/jcb.20886. PubMed PMID: 16619257.
41. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238(1):265–72. doi: 10.1006/excr.1997.3858. PubMed PMID: 9457080.
42. Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(367 Suppl):S156-62. PubMed PMID: 10546644.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143–7. PubMed PMID: 10102814.
44. Vayssade M, Nagel M-D. Stromal cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:210–24. PubMed PMID: 19273064.
45. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–95. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105. PubMed PMID: 12475952.

46. Bari C de, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44(8):1928–42. doi: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928:AID-ART331>3.0.CO;2-P.
47. Correa D, Lietman SA. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin Cell Dev Biol*. 2016. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.013. PubMed PMID: 27422331.
48. Robertson JA. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat Rev Genet*. 2001;2(1):74–8. doi: 10.1038/35047594. PubMed PMID: 11253076.
49. Punwar S, Khan WS. Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *Open Orthop J*. 2011;5 Suppl 2:296–301. doi: 10.2174/1874325001105010296. PubMed PMID: 21886696.
50. Filardo G, Perdisa F, Roffi A, Marcacci M, Kon E. Stem cells in articular cartilage regeneration. *J Orthop Surg Res*. 2016;11:42. doi: 10.1186/s13018-016-0378-x. PubMed PMID: 27072345.
51. Khan WS, Johnson DS, Hardingham TE. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *Knee*. 2010;17(6):369–74. doi: 10.1016/j.knee.2009.12.003. PubMed PMID: 20051319.
52. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(2):226–31. doi: 10.1016/j.joca.2006.08.008. PubMed PMID: 17002893.
53. Angele P, Kujat R, Koch M, Zellner J. Role of mesenchymal stem cells in meniscal repair. *J Exp Orthop*. 2014;1(1):12. doi: 10.1186/s40634-014-0012-y. PubMed PMID: 26914757.
54. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H. *Pharmakologie und Toxikologie*. 2nd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2016. 836 Seiten.

55. Piper SL, Kramer JD, Kim HT, Feeley BT. Effects of local anesthetics on articular cartilage. *Am J Sports Med.* 2011;39(10):2245–53. doi: 10.1177/0363546511402780. PubMed PMID: 21515808.
56. Miskulin M, Maldini B. Outpatient arthroscopic knee surgery under multimodal analgesic regimens. *Arthroscopy.* 2006;22(9):978–83. doi: 10.1016/j.arthro.2006.05.014. PubMed PMID: 16952728.
57. Marret E, Gentili M, Bonnet MP, Bonnet F. Intra-articular ropivacaine 0.75% and bupivacaine 0.50% for analgesia after arthroscopic knee surgery: a randomized prospective study. *Arthroscopy.* 2005;21(3):313–6. doi: 10.1016/j.arthro.2004.11.005. PubMed PMID: 15756185.
58. Baker JF, Mulhall KJ. Local anaesthetics and chondrotoxicity: What is the evidence? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(11):2294–301. doi: 10.1007/s00167-011-1804-6. PubMed PMID: 22134409.
59. Chu CR, Izzo NJ, Coyle CH, Papas NE, Logar A. The in vitro effects of bupivacaine on articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90(6):814–20. doi: 10.1302/0301-620X.90B6.20079. PubMed PMID: 18539679.
60. Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. *Am J Sports Med.* 2007;35(10):1621–7. doi: 10.1177/0363546507304719. PubMed PMID: 17664340.
61. Chu CR, Coyle CH, Chu CT, Szczodry M, Seshadri V, Karpie JC, et al. In vivo effects of single intra-articular injection of 0.5% bupivacaine on articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(3):599–608. doi: 10.2106/JBJS.I.00425. PubMed PMID: 20194318.
62. Matsen FA3, Papadonikolakis A. Published evidence demonstrating the causation of glenohumeral chondrolysis by postoperative infusion of local anesthetic via a pain pump. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(12):1126–34. doi: 10.2106/JBJS.L.01104. PubMed PMID: 23783210.

63. Noyes FR, Fleckenstein CM, Barber-Westin SD. The development of postoperative knee chondrolysis after intra-articular pain pump infusion of an anesthetic medication: a series of twenty-one cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(16):1448–57. doi: 10.2106/JBJS.K.01333. PubMed PMID: 22786851.
64. Breu A, Rosenmeier K, Kujat R, Angele P, Zink W. The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. *Anesth Analg.* 2013;117(2):514–22. doi: 10.1213/ANE.0b013e31829481ed. PubMed PMID: 23749443.
65. Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(5):986–91. doi: 10.2106/JBJS.G.01033. PubMed PMID: 18451389.
66. Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW, 4th. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(3):609–18. doi: 10.2106/JBJS.H.01847. PubMed PMID: 20194319.
67. Breu A, Eckl S, Zink W, Kujat R, Angele P. Cytotoxicity of local anesthetics on human mesenchymal stem cells in vitro. *Arthroscopy.* 2013;29(10):1676–84. doi: 10.1016/j.arthro.2013.06.018. PubMed PMID: 23993145.
68. Lucchinetti E, Awad AE, Rahman M, Feng J, Lou P-H, Zhang L, et al. Antiproliferative effects of local anesthetics on mesenchymal stem cells: potential implications for tumor spreading and wound healing. *Anesthesiology.* 2012;116(4):841–56. doi: 10.1097/ALN.0b013e31824babfe. PubMed PMID: 22343474.
69. Rahnama R, Wang M, Dang AC, Kim HT, Kuo AC. Cytotoxicity of local anesthetics on human mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(2):132–7. doi: 10.2106/JBJS.K.01291. PubMed PMID: 23324960.
70. Dregalla RC, Lyons NF, Reischling PD, Centeno CJ. Amide-type local anesthetics and human mesenchymal stem cells: clinical implications for stem cell therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(3):365–74. doi: 10.5966/sctm.2013-0058. PubMed PMID: 24436443.

71. Gray A, Marrero-Berrios I, Weinberg J, Manchikalapati D, SchianodiCola J, Schloss RS, et al. The effect of local anesthetic on pro-inflammatory macrophage modulation by mesenchymal stromal cells. *Int Immunopharmacol*. 2016;33:48–54. doi: 10.1016/j.intimp.2016.01.019. PubMed PMID: 26854576.
72. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(12):1745–57. PubMed PMID: 9875932.
73. Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B. Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng*. 1999;5(6):545–54. doi: 10.1089/ten.1999.5.545. PubMed PMID: 10611546.
74. Sulc K, Neuwirt J, Travnicek T, Kobylka P, Radikovska E. Bone marrow cell separation on Ficoll gradient. *Haematologia (Budap)*. 1977;11(1-2):41–6. PubMed PMID: 352852.
75. Kuettner KE, Kimura JH. Proteoglycans: an overview. *J Cell Biochem*. 1985;27(4):327–36. doi: 10.1002/jcb.240270403. PubMed PMID: 3922997.
76. Taylor KB, Jeffree GM. A new basic metachromatic dye, 1:9-dimethyl methylene blue. *Histochem J*. 1969;1(3):199–204. PubMed PMID: 4113282.
77. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*. 1981;75(6):816–21. PubMed PMID: 6167159.
78. Olmsted J3, Kearns DR. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry*. 1977;16(16):3647–54. PubMed PMID: 889813.
79. Huang T-C, Lee J-F, Chen J-Y. Pardaxin, an antimicrobial peptide, triggers caspase-dependent and ROS-mediated apoptosis in HT-1080 cells. *Mar Drugs*. 2011;9(10):1995–2009. doi: 10.3390/md9101995. PubMed PMID: 22073006.

80. Trotta E, D'Ambrosio E, Ravagnan G, Paci M. Evidence for DAPI intercalation in CG sites of DNA oligomer d(CGACGTCG)₂: a ¹H NMR study. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(8):1333–40. PubMed PMID: 7753623.
81. Dusemund B, Barrach HJ. Double-antibody enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of collagen types I and II. *J Immunol Methods.* 1982;50(3):255–68. PubMed PMID: 7047644.
82. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.* 1998;47:487–504. PubMed PMID: 9571450.
83. Schewe B, Fritz J, Weise K. Knorpelverletzungen am Kniegelenk. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date.* 2008;3(2):77–94. doi: 10.1055/s-2007-995662.
84. Fritz J, Janssen P, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. Articular cartilage defects in the knee--basics, therapies and results. *Injury.* 2008;39 Suppl 1:S50-7. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.039. PubMed PMID: 18313472.
85. Stoddart MJ, Grad S, Eglin D, Alini M. Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering. *Regen Med.* 2009;4(1):81–98. doi: 10.2217/17460751.4.1.81. PubMed PMID: 19105618.
86. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 2003;22(1):81–91. PubMed PMID: 12714045.
87. McClelland Descalzo DL, Ehnes DD, Zur Nieden NI. Stem cells for osteodegenerative diseases: current studies and future outlook. *Regen Med.* 2014;9(2):219–30. doi: 10.2217/rme.13.100. PubMed PMID: 24750062.
88. Oldershaw RA. Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(6):389–400. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00837.x. PubMed PMID: 23075006.

89. Mamidi MK, Das AK, Zakaria Z, Bhonde R. Mesenchymal stromal cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(8):1307–16. doi: 10.1016/j.joca.2016.03.003. PubMed PMID: 26973328.
90. Jayasuriya CT, Chen Y, Liu W, Chen Q. The influence of tissue microenvironment on stem cell-based cartilage repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2016. doi: 10.1111/nyas.13170. PubMed PMID: 27464254.
91. Becker DE, Reed KL. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. *Anesth Prog*. 2012;59(2):90-101; quiz 102-3. doi: 10.2344/0003-3006-59.2.90. PubMed PMID: 22822998.
92. Slabaugh MA, Friel NA, Cole BJ. Rapid chondrolysis of the knee after anterior cruciate ligament reconstruction: a case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(1):186–9. doi: 10.2106/JBJS.I.00120. PubMed PMID: 20048111.
93. Heng BC, Cao T, Lee EH. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(7):1152–67. doi: 10.1634/stemcells.2004-0062. PubMed PMID: 15579636.
94. Breu A, Sprinzing B, Merkl K, Bechmann V, Kujat R, Jenei-Lanzl Z, et al. Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Orthop Res*. 2011;29(10):1563–71. doi: 10.1002/jor.21424. PubMed PMID: 21469181.
95. Jenei-Lanzl Z, Straub RH, Dienstknecht T, Huber M, Hager M, Grassel S, et al. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum*. 2010;62(4):1088–96. doi: 10.1002/art.27328. PubMed PMID: 20131256.
96. Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(5):1016–25. doi: 10.1210/jcem-73-5-1016. PubMed PMID: 1719016.

97. Berde GB, Strichartz GR. Local anesthetics. In: Miller RD, Eriksson LI, La Fleisher, editors. Miller's Anesthesia. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010. p. 913–40.
98. Haasters F, Polzer H, Prall WC, Saller MM, Kohler J, Grote S, et al. Bupivacaine, ropivacaine, and morphine: comparison of toxicity on human hamstring-derived stem/progenitor cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(12):2138–44. doi: 10.1007/s00167-011-1564-3. PubMed PMID: 21647658.
99. Debruyne D, Moulin MA, Carmes C, Beguin JA, Locker B. Monitoring serum bupivacaine levels during arthroscopy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1985;27(6):733–5. PubMed PMID: 3987779.
100. Kaeding CC, Hill JA, Katz J, Benson L. Bupivacaine use after knee arthroscopy: pharmacokinetics and pain control study. *Arthroscopy.* 1990;6(1):33–9. PubMed PMID: 2310448.
101. Katz JA, Kaeding CS, Hill JR, Henthorn TK. The pharmacokinetics of bupivacaine when injected intra-articularly after knee arthroscopy. *Anesth Analg.* 1988;67(9):872–5. PubMed PMID: 3414999.
102. Syed HM, Green L, Bianski B, Jobe CM, Wongworawat MD. Bupivacaine and triamcinolone may be toxic to human chondrocytes: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(10):2941–7. doi: 10.1007/s11999-011-1834-x. PubMed PMID: 21384211.
103. Park J, Sutradhar BC, Hong G, Choi SH, Kim G. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. *Vet Anaesth Analg.* 2011;38(2):127–33. doi: 10.1111/j.1467-2995.2010.00590.x. PubMed PMID: 21303444.
104. Eyre DR. The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum.* 1991;21(3 Suppl 2):2–11. PubMed PMID: 1796302.
105. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008;87:77–95. doi: 10.1093/bmb/ldn025. PubMed PMID: 18676397.

106. Lee JI, Sato M, Ushida K, Mochida J. Measurement of diffusion in articular cartilage using fluorescence correlation spectroscopy. *BMC Biotechnol.* 2011;11:19. doi: 10.1186/1472-6750-11-19. PubMed PMID: 21366913.
107. Farkas B, Kvell K, Czompoly T, Illes T, Bardos T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(11):3112–20. doi: 10.1007/s11999-010-1443-0. PubMed PMID: 20700677.
108. Zink W, Seif C, Bohl JRE, Hacke N, Braun PM, Sinner B, et al. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesth Analg.* 2003;97(4):1173-9, table of contents. PubMed PMID: 14500177.
109. Zink W, Graf BM. Benefit-risk assessment of ropivacaine in the management of postoperative pain. *Drug Saf.* 2004;27(14):1093–114. PubMed PMID: 15554745.
110. Graf BM, Zausig Y, Zink W. Current status and clinical relevance of studies of minimum local-anaesthetic concentration (MLAC). *Curr Opin Anaesthesiol.* 2005;18(3):241–5. doi: 10.1097/01.aco.0000169228.68314.07. PubMed PMID: 16534344.
111. Zink W, Graf BM. Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms. *Anaesthesist.* 2003;52(12):1102–23. doi: 10.1007/s00101-003-0617-5. PubMed PMID: 14691623.
112. Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, et al. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs.* 2010;192(3):158–66. doi: 10.1159/000313399. PubMed PMID: 20407224.
113. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1377–88. doi: 10.1002/art.23370. PubMed PMID: 18438858.
114. Hartmann A. Zelluläre Seneszenz von Chondrozyten unter oxidativem Stresseinfluss; 2012. X, 90 S.

115. Sprinzing K. Zelluläre Seneszenz von mesenchymalen Stammzellen unter Einfluss von 17beta-Östradiol und Tamoxifen; 2012. 103 p.
116. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3254–66. doi: 10.1002/art.22136. PubMed PMID: 17009260.
117. Bari C de, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):142–50. doi: 10.1002/art.11450. PubMed PMID: 14730610.
118. Assefa Z, Bultynck G, Szlufcik K, Nadif Kasri N, Vermassen E, Goris J, et al. Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(41):43227–36. doi: 10.1074/jbc.M403872200. PubMed PMID: 15284241.
119. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):552–65. doi: 10.1038/nrm1150. PubMed PMID: 12838338.
120. Tian J, Xie Z-j. The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:205–11. doi: 10.1152/physiol.00008.2008. PubMed PMID: 18697994.
121. Takahashi S. Local anaesthetic bupivacaine alters function of sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal vesicles from rabbit masseter muscle. *Pharmacol Toxicol.* 1994;75(3-4):119–28. PubMed PMID: 7800651.
122. Kutchai H, Geddis LM, Farley RA. Effects of local anaesthetics on the activity of the Na,K-ATPase of canine renal medulla. *Pharmacol Res.* 2000;41(1):1–7. doi: 10.1006/phrs.1999.0547. PubMed PMID: 10600263.

123. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568–84.
doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.001. PubMed PMID: 15010324.
124. Brandsson S, Karlsson J, Morberg P, Rydgren B, Eriksson BI, Hedner T. Intraarticular morphine after arthroscopic ACL reconstruction: a double-blind placebo-controlled study of 40 patients. *Acta Orthop Scand.* 2000;71(3):280–5.
doi: 10.1080/000164700317411889. PubMed PMID: 10919300.
125. Muller M, Burkhardt J, Borchardt E, Buttner-Janz K. Postoperative analgesic effect after intra-articular morphine or ropivacaine following knee arthroscopy - a prospective randomized, doubleblinded study. *Schmerz.* 2001;15(1):3–9. PubMed PMID: 11810323.
126. Joshi GP, McCarroll SM, Cooney CM, Blunnie WP, O'Brien TM, Lawrence AJ. Intra-articular morphine for pain relief after knee arthroscopy. *J Bone Joint Surg Br.* 1992;74(5):749–51. PubMed PMID: 1527127.
127. Joshi GP, McCarroll SM, Brady OH, Hurson BJ, Walsh G. Intra-articular morphine for pain relief after anterior cruciate ligament repair. *Br J Anaesth.* 1993;70(1):87–8. PubMed PMID: 8431341.

6.4 Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Local anesthetic cytotoxicity on human mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation

Anita Breu, Ingrid Scheidhammer, Richard Kujat, Bernhard Graf, Peter Angele

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2015) 23:937–945

6.5 Erklärung zur Dissertation

Herr Prof. Dr. med. Peter Angele und Frau PD Dr. med. Anita Breu haben die Dissertation angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

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 und 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.

6.6 Danksagung

Besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. M. Nerlich für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Themas. Auch über die ermöglichte Teilnahme am Forschungswochenende habe ich mich sehr gefreut.

Herrn Professor Dr. P. Angele danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Dr. Anita Breu für die Themenstellung, die exzellente Betreuung der Laborarbeit und die unkomplizierte und inspirierende Zusammenarbeit.

Dem Leiter des Labors der Unfallchirurgie, Herrn Dr. Richard Kujat, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellung bei mancherlei Problemen danken.

Persönlich und besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Daniela Drenkard, die mich kompetent und geduldig in die Laborarbeit eingeführt hat und mir bei dieser Arbeit jederzeit als zuverlässiger Ansprechpartner zur Seite stand. Dank ihr war der Laboralltag stets lustig und unterhaltsam, sodass ich immer gerne ins Labor für Unfallchirurgie gegangen bin.

Frau Swetlana Stryhskowa danke ich für die Bereitstellung der Medien und Substanzen in der Zellkultur.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern für die Förderung meines bisherigen Werdeganges. Sie waren immer für mich da und haben es erst ermöglicht, dass ich bis zu diesem Punkt gekommen bin.

Zuletzt danke ich meiner großen Liebe Thomas für seine unermüdliche, liebevolle Unterstützung während des gesamten Medizinstudiums, bei dieser Doktorarbeit und bei allem anderen.