

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. MICHAEL NERLICH
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**VEGF- und Kollagenbildung von Meniskuszellreihen und mesenchymalen
Stammzellen alleine**

sowie

im Zusammenspiel mit Gelatine-Hyaluronsäurematrices

zur

Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Roman Flühr

2017

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. MICHAEL NERLICH
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**VEGF- und Kollagenbildung von Meniskuszellreihen und mesenchymalen
Stammzellen alleine**

sowie

im Zusammenspiel mit Gelatine-Hyaluronsäurematrices

zur

Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Roman Flühr

2017

Dekan:
1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert
PD Dr. Johannes Zellner
PD Dr. Christian Eichelberg
08.08.2017

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Anatomie der Menisken	1
1.1.1 Histologischer Aufbau der Menisken	4
1.1.2 Gefäßversorgung der Menisken	6
1.2 Funktion der Menisken	7
1.3 Ätiologie der Meniskuläsionen	8
1.4 Klassifikation von Meniskuläsionen	9
1.5 Therapie von Meniskuläsionen	11
1.6 Regeneration von Meniskusdefekten mittels Tissue Engineering	13
1.7 Zytokinetische Vorgänge einer Meniskuläsion	17
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	22
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.3 Antikörper und Enzyme	27
2.1.4 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren	27
2.1.5 Kits	28
2.1.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren	28
2.1.7 Puffer und Lösungen	28
2.1.8 Medikamente	31
2.1.9 Tiere	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Zellkultur humaner mesenchymaler Stammzellen	32
2.2.2 Zellkultur humaner Meniskuszellen	32

2.2.3	Zellkultur mesenchymaler Stammzellen von New Zealand White Rabbits	33
2.2.4	Zellkultur der Meniskuszellen von New Zealand White Rabbits	34
2.2.5	Gewinnung der jeweiligen Zellart aus den Zellkulturflaschen	35
2.2.6	Auszählen der abtrypsinierten Zellen	36
2.2.7	Anlegen von Zellaggregaten	36
2.2.8	Beimpfen der Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrices mit Zellen	37
2.2.9	Implantieren der zellbeladenen Matrices in Meniskusstanzdefekte des Kaninchens	38
2.2.10	Beschichten der Objektträger vor Aufbringen der histologischen Schnitte	39
2.2.11	Objektgewinnung für Histologie	39
2.2.12	Aufbringen der Zellaggregate, Zell-Matrix-Konstrukte und Zell-Matrix-Konstrukte im Meniskusdefekt auf Objektträger für histologische Auswertung	40
2.3	Analytik	41
2.3.1	Fotographie der entdifferenzierten Zellaggregate	41
2.3.2	DMMB (1,9-Dimethyl-Methylenblau)-Färbung	41
2.3.3	Immunhistochemische Kollagen I- und II-Färbung	41
2.3.4	Mikroskopie der Schnitte	42
2.3.5	VEGF-ELISA-Tests	42
2.3.6	Auswertungen gefärbter humaner Zellaggregate und von VEGF-ELISA-Tests des Differenzierungsmediums humaner Zellaggregate	43
2.3.7	Auswertungen gefärbter Kaninchenzellaggregate und von VEGF-ELISA-Tests des Differenzierungsmediums der Kaninchenzellaggregate	44

2.3.8	Auswertungen gefärbter Kaninchenzell-Matrixkonstrukte und von VEGF-ELISA-Tests des Differenzierungsmediums der Kaninchenzell-Matrixkonstrukte	44
2.3.9	Auswertung gefärbter Meniskusdefekte alleine sowie mit zellfreien Gelatine-Hyaluronsäure-Matrices und mit Kaninchenzellen beladene Gelatine-Hyaluronsäure-Matrices und von VEGF-ELISA-Tests ihrer Differenzierungsmedien	45
2.3.10	Statistik	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	humane Zellaggregate	47
3.1.1	Färbungen und VEGF-ELISA-Tests	47
3.1.2	Zusammenfassung der humanen Zellaggregate	55
3.2	Kaninchenzellaggregate	56
3.2.1	Färbungen und VEGF-ELISA-Tests	56
3.2.2	Zusammenfassung der Kaninchenzellaggregate	64
3.3	Zell-Matrix-Konstrukte von Kaninchenzellreihen	65
3.3.1	Färbungen und VEGF-ELISA-Tests	65
3.3.2	Zusammenfassung der Zell-Matrix-Konstrukte von Kaninchenzellreihen	72
3.4	Meniskusringe	74
3.4.1	Meniskusring mit Leerdefekt und Meniskusring mit Leermatrix im Leerdefekt	74
3.4.2	Zell-Matrixbehandlung eines Meniskusdefektes in vitro	76
3.4.2.1	Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich	76

3.4.2.2 Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen	
aus dem avaskulären Bereich	79
3.4.2.3 Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt	
aus dem vaskulären und avaskulären Bereich	82
3.4.2.4 Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen	85
3.4.3 Zusammenfassung der Meniskusringe	88
4. Diskussion	91
5. Zusammenfassung	96
6. Literatur	98
7. Anhang	120
7.1 Lebenslauf	120
7.2 Danksagung	121

1. Einleitung

Durch ein größer gewordenenes sportliches Betätigungsfeld ist die Häufigkeit muskuloskelettaler Verletzungen gestiegen. Meniskusläsionen stellen hierbei einen Großteil dar, wovon Verletzungen im avaskulären Anteil des Meniskus 70% betragen [59].

Die partielle Meniskektomie stellt eine der am häufigsten ambulant durchgeführten operativen Eingriffe in der Orthopädie/Unfallchirurgie dar [60]. So stieg zwischen den Jahren 1989 bis 1996 die Anzahl der partiellen Meniskektomien von 11100 auf 155100 [55]. Die DRG-Statistik belegt, dass 2013 ca. 300000 Meniskusoperationen durchgeführt wurden [1]. Dies hat eine negative Auswirkung auf die Volkswirtschaft [56][57][58].

Bei Meniskusschäden war bis in die siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts die komplette Meniskektomie etabliert. Grund dafür lag in dem fehlenden Wissen bezüglich der Meniskusfunktion. Nach kompletter Meniskektomie konnte Fairbank bereits 1948 radiologische Veränderungen im betroffenen Kniegelenk nachweisen [71]. Selbst Meniskusteilresektionen von nur 15% bis 34% erhöhen den Druck auf den Gelenkknorpel auf 350% [40][69]. Die Mehrbelastung auf die Gelenkflächen führt zur Gonarthrose.

Vor diesem Hintergrund ist eine Weiterentwicklung neuerer Therapieoptionen anzustreben.

1.1. Anatomie der Menisken

Menisken haben innerhalb des Kniegelenks verschiedenste Aufgaben, was ihre Form und Struktur erklärt.

Im Kniegelenk unterscheidet man zwischen einem medialen sowie einem lateralen Meniskus. An der Gelenkbasis sind sie bis zu 1,5 cm hoch, sie verjüngen sich in Richtung Gelenkzentrum. So haben sie im Querschnitt die Form eines Keils und bestehen aus einem Vorder- sowie einem Hinterhorn. Der Innenmeniskus hat eine halbmondförmige, der Außenmeniskus eine ringförmige Gestalt.

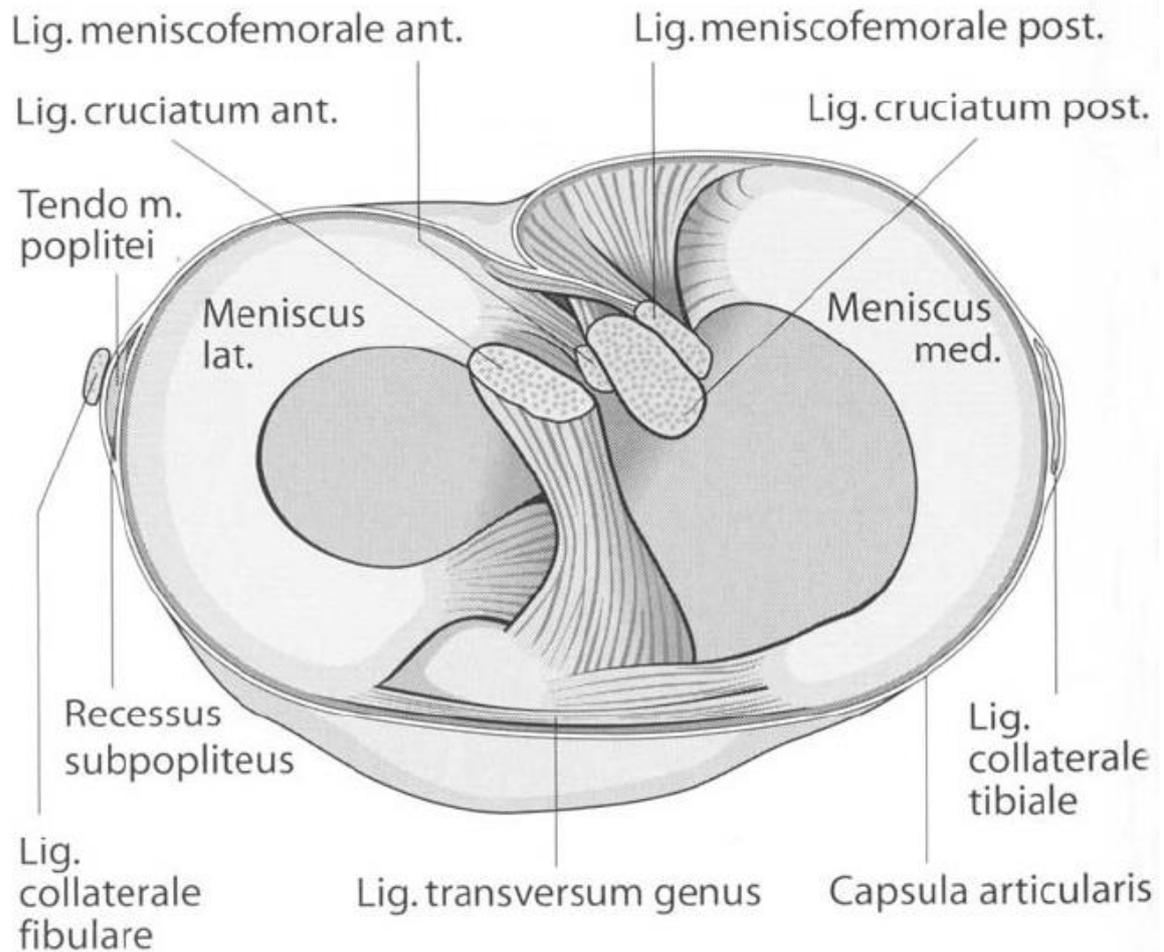


Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines horizontalen Schnitts durch das Kniegelenk proximal der Meniskusebene (Praxisbuch Unfallchirurgie 2004, Weigel, Nerlich, S. 588)

Die Menisken des menschlichen Kniegelenkes sind transportable Gelenkflächen, die die Inkongruenz zwischen Femurkondylen und Tibiaplateau ausgleichen, wobei sie 70% des Tibiaplateaus bedecken. Zur Seite der Femurkondylen bilden sie eine konkave Form, auf Seiten des Tibiaplateaus sind sie flach.

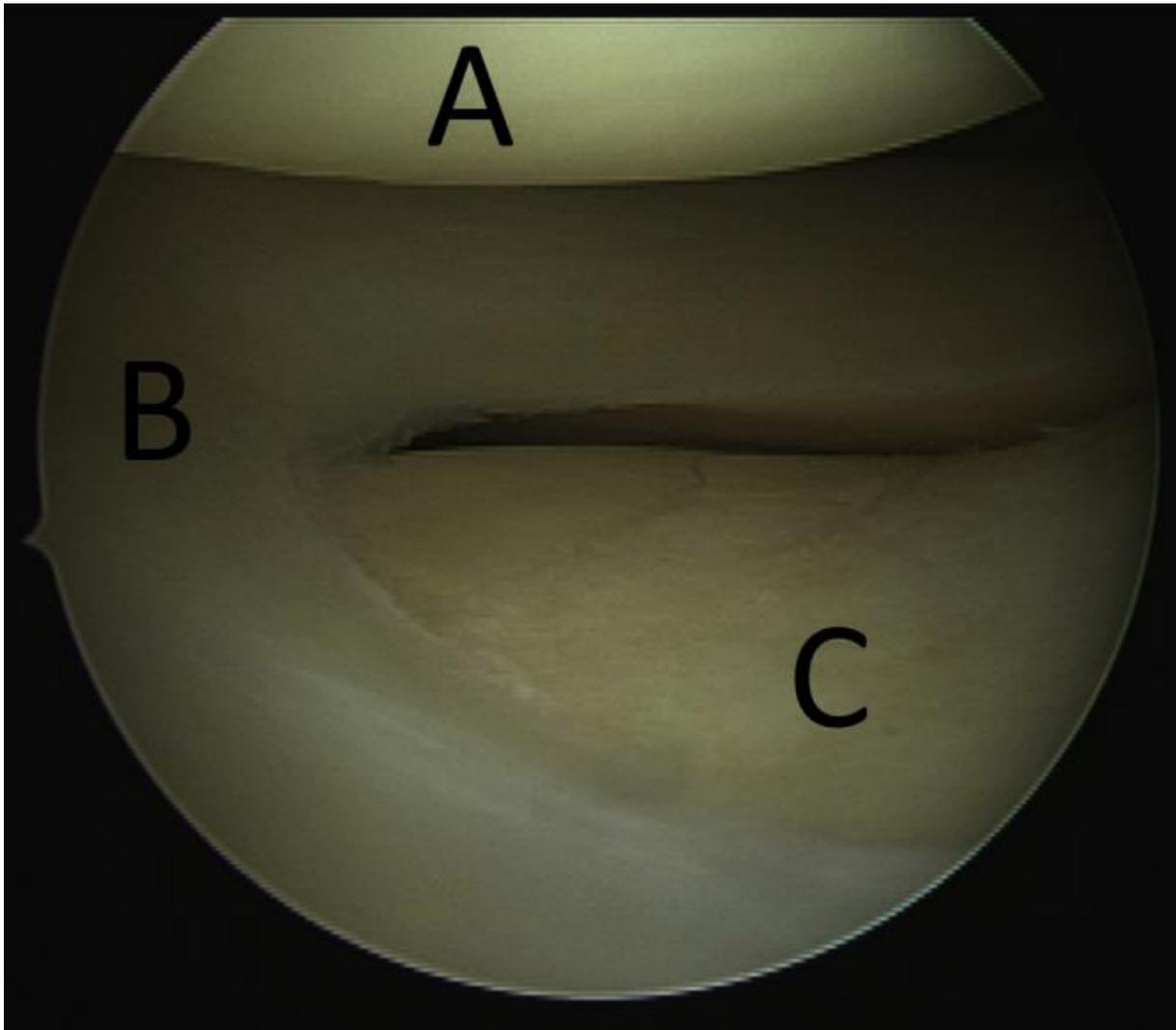
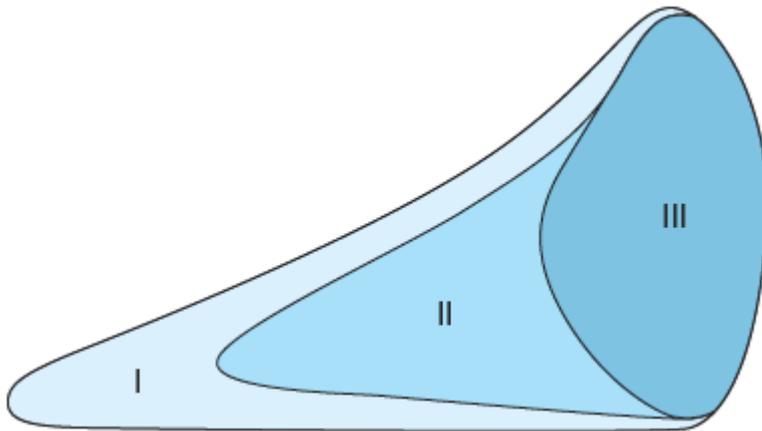


Abb. 1.2 Arthroskopische Aufnahme eines unverletzten Kniegelenks. A: Laterale Femurkondyle, B: intakter Außenmeniskus, C: laterales Tibiaplateau. Der nach innen spitz zulaufende Außenmeniskus reicht nicht bis zum Innenmeniskus heran und beide Menisken unterteilen das Kniegelenk somit nur unvollständig. (Benjamin D. Ward, M.D., James H. Lubowitz, M.D., “Basic Knee Arthroscopy Part 3: Diagnostic Arthroscopy”, Arthrosc Tech, Nov. 2013)

Sowohl Innen- als auch Außenmeniskus sind im Gelenk verankert. So ist der Innenmeniskus vorne an der Fossa intercondylaris vor dem Ansatz des vorderen Kreuzbandes verankert, hinten zwischen der Insertion des hinteren Kreuzbandes und der Insertion des Außenmeniskus. Die Peripherie ist mit der Gelenkkapsel verbunden. Der Außenmeniskus ist vorne an der Fossa intercondylaris hinter der Insertion des vorderen Kreuzbandes verankert, hinten vor dem Innenmeniskus auf dem Tibiaplateau. Eine Verankerung mit der Gelenkkapsel besteht nicht, allerdings existieren variabel ausgebildete femorale Befestigungen, die sogenannten Humphrey- und Wrisberg-Ligamente.

1.1.1 Histologischer Aufbau der Menisken

Innerhalb des Meniskus bestehen belastungsinduzierte Strukturunterschiede. Es finden sich 3 Schichten.



- I Faserknorpelzone
- II Faserknorpel und straffes kollagenfasriges Bindegewebe
- III Straffes kollagenfasriges Bindegewebe

Abb.1.3 Schematische Darstellung des Meniskus im Querschnitt und dessen Gewebsvorkommen. (Orthopädie und orthopädische Chirurgie 2005, Wirth, Zichner, S.21)

Die mit 1 bezifferten Schicht stellt die Oberflächenschicht dar, welche sehr dünn ist und den Meniskus sowohl auf der Femoral-, als auch auf der Tibialseite bedeckt.

In der mit 2 bezifferten Schicht finden sich lamellenartige Fasersysteme. Im Bereich der Basis sind die parallel verlaufenden Kollagenfibrillenbündel radiär ausgerichtet, im Innern des Meniskus überkreuzen sich die Faserlamellen unter verschiedenen Winkeln.

Im zentralen Teil des Meniskus, welcher mit 3 gekennzeichnet ist, sind die Kollagenfibrillenbündel in allen Bereichen zirkulär angeordnet. An der Meniskusbasis dringt lockeres Bindegewebe zwischen die zirkulär verlaufenden Fibrillenbündel.

Die oberflächlichen Zellen haben wenige Aufgaben, sind oval und spindelförmig und beinhalten wenig Zytoplasma, weswegen die Kerne der Zelle abnorm groß erscheinen [22][23]. Die Zellen der tieferen Meniskusschichten sind rund oder polygonal, sind höchstens

in Gruppen von bis zu drei Zellen angeordnet und enthalten eine große Menge an endoplasmatischem Retikulum [22][23]. Des Weiteren sind im Meniskus Endothelzellen enthalten [24]. Im Bereich verletzten Gewebes finden sich gelegentlich Myofibroblasten [23].

Im Meniskus konnten die Kollagentypen I, II, III, V und VI nachgewiesen werden, welche 60-70% des Trockengewichts ausmachen [25].

Auch stellen die Zellen des Meniskus keine einheitliche Population dar [16]. Kollagen I macht einen Anteil von über 90% des Gesamtkollagens im Meniskus aus [17]. In der avaskulären Zone ist der Anteil von Kollagen I 40%, 60% bestehen aus Kollagen II [18].

Im Meniskus liegt eine stark vernetzte Architektur von extrazellulärer Matrix aus Kollagenfibrillen und eingelagerter Grundsubstanz vor [19]. Das Kollagen I, welches besonders bei Zugkräften beansprucht wird, ist im Meniskus umlaufend angeordnet. Hierbei verhindern die so angeordneten Kollagenfibrillen die Verdrängung des Meniskus nach außen und halten somit die Integration des Meniskus während einer Belastung aufrecht [20][21]. Die Kollagenfibrillen haben die Fähigkeit zur Absorption von Zugkräften, die Grundsubstanz ermöglicht die Resistenz gegen Druck- und Dehnungsbewegungen[15].

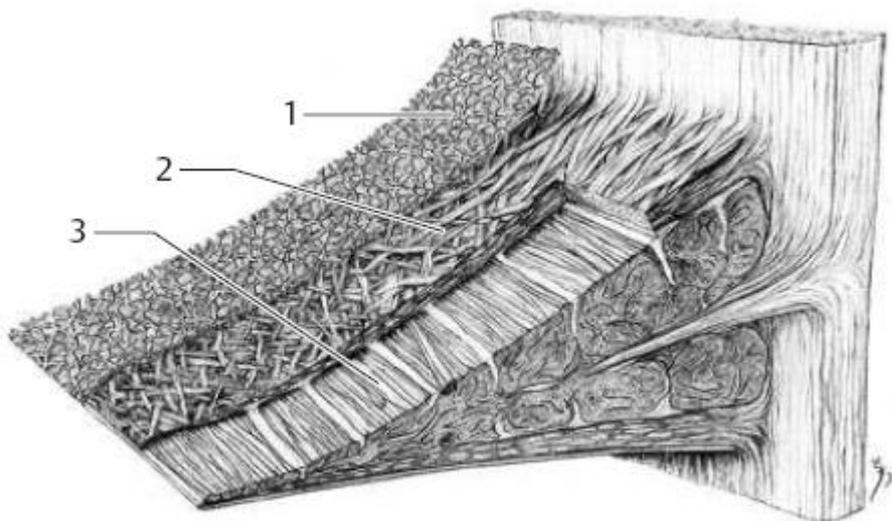


Abb. 1.4 Zeichnerische Darstellung des Kollagenfibrillenverlaufs innerhalb des Meniskus nach Rasterelektronischen Befunden. (Orthopädie und orthopädische Chirurgie 2005, Wirth, Zichner, S. 21)

Weitere Bestandteile des Meniskus sind die Glykosaminoglykane (GAGs). Die GAGs spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des viskoelastischen Verhaltens, des

Druckwiderstandes und der Wassereinlagerung. 75% des Meniskus bestehen aus Wasser. Außerdem sind GAGs neben anderen Oberflächenproteinen dafür zuständig, eine glatte, reibungslose Bewegung der Menisken auf der Gelenkoberfläche zu gewährleisten [20][21].

1.1.2 Gefäßversorgung der Menisken

Die Blutversorgung der Menisken erfolgt über Gefäße der Gelenkkapsel [26][27][28]. Die Gefäße wachsen zentripetal in den Meniskus hinein. Die Gefäße entstammen aus den oberen und unteren Ästen der lateralen und medialen Arteriae geniculares, die sich als perimeniskaler kapillärer Plexus an der Basis der Menisken bilden. Weitere Aufästelungen der Gefäße versorgen ca. 20-30% des Innenmeniskus und 10-25% des Außenmeniskus. Zum Zeitpunkt der Geburt ist der Meniskus noch vollständig vaskularisiert [28]. Im Erwachsenenalter ist nur noch der äußere Teil des Meniskus vaskularisiert, der innere Teil entspricht der avaskulären Zone des Meniskus. Dieser wird durch Diffusion von der Synovialflüssigkeit ernährt, wofür spezielle Poren für die Synovialflüssigkeit vorhanden sind [29]. Bei der Vaskularisation unterscheidet man drei verschiedene Zonen. Das gut durchblutete äußere Drittel, die sogenannte „rot-rote Zone“, das nicht durchblutete innere Drittel des Meniskus, die „weiß-weiße Zone“ und dazwischen die „rot-weiße Zone“, die eine geringe Durchblutung aufweist [19][26][30].

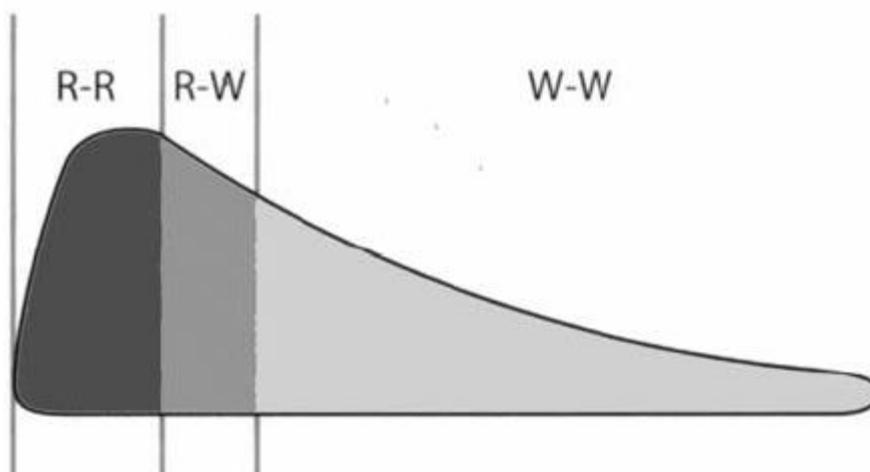


Abb. 1.5 Schematische Darstellung eines Meniskusquerschnitts. Die außen gelegene Rot-Rote Zone stellt den vaskularisierten Bereich des Meniskus dar. Die innen gelegene Weiß-Weiße Zone stellt den avaskulären Bereich dar. Die Rot-Weiße Zone entspricht der intermediär gelegenen Übergangszone. (Praxisbuch Unfallchirurgie 2004, Weigel, Nerlich)



Abb. 1.6 Querschnitt des hinteren Bereichs eines Meniskus des Erwachsenen. Die Gefäßdarstellung erfolgte mittels arterieller Injektion eines Tusche-Gelatine-Präparates nach Spateholz (1914). Von der Gelenkkapsel aus treten die Gefäße in den äußeren Bereich der Meniskusbasis. (Orthopädie und orthopädische Chirurgie 2005, Wirth, Zichner, S. 21)

1.2 Funktion der Menisken

Früher wurden die Menisken noch als funktionslose Komponenten der Beinmuskulatur angesehen [75]. Heute sind mehrere Funktionen der Menisken bekannt.

Die Menisken übernehmen etwa ein Drittel der im Kniegelenk übertragenen Kraft. Sie übernehmen zudem Funktionen in der Schockabsorption [2][3][4], in der Kraftverteilung [5][6][7][8], in der Lubrikation [9], in der Knorpelernährung, in der Propriozeption [10][11] und in der Kniestabilisierung [12][13][14][15].

Die Schockabsorption wird dadurch gewährleistet, dass die viskoelastischen Menisken während einer Belastung ihre Form verändern können.

Die Kraftverteilung übernimmt der Meniskus dadurch, dass er die einwirkende Kraft durch den Inkongruenzausgleich auf eine größere Fläche verteilt und sich außerdem die axialen Kräfte in eine Ringspannung umverteilen.

Durch die Bewegung und damit der Verteilung der Gelenkflüssigkeit auf den Gelenkknorpel wird die Knorpelernährung und Lubrikation des Gelenks unterstützt.

In den Menisken sind Nervenenden enthalten, die eine propriozeptive Aussage über die Stellung des Kniegelenks geben.

Menisken erhöhen die Stabilität des Kniegelenks. Nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes besteht bei intaktem Innenmeniskus im Gegensatz zu einem lädierten Innenmeniskus eine erhöhte Stabilität.

Die Menisken wirken als Agonisten des vorderen Kreuzbandes, indem sie sich wie Keile zwischen die Femurkondylen und das Tibiaplateau schieben. Um bei einer Krafteinwirkung nicht verletzt zu werden, sind die Menisken befähigt, je nach Gelenkstellung ihre Lage zu verändern. So wandern die Menisken beispielsweise bei Beugung des Kniegelenks nach hinten, bei Streckung nach vorne. Ähnlich verhalten sie sich bei der Kniegelenksrotation.

1.3 Ätiologie der Meniskusläsionen

Auch ändert sich im Laufe des Lebens die Genexpression des Meniskus. Im Alter zwischen 8 und 16 Jahren findet man eine hohe Proteoglykansynthese, während im späteren Alter die Bildung von Decorin und Biglykan deutlich überwiegt [31]. Auch dies führt, wie auch die Änderung der Blutversorgung, zu einer erhöhten Prävalenz der Arthrose des Kniegelenks im Alter. Ab dem vierzigsten Lebensjahr setzt ein natürlicher Verschleiß des Meniskus ein[32].

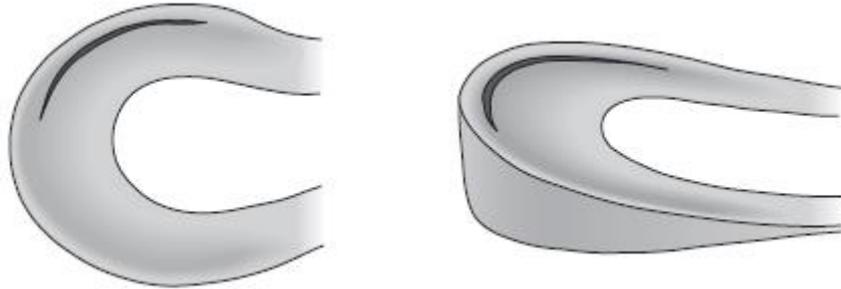
Eine Meniskusläsion ist aufgrund größerer Gewalteinwirkungen, als Folge von Distorsionen oder nach Kniegelenksbänderläsionen möglich.

Aufgrund der geringeren Verschieblichkeit des Innenmeniskus gegenüber dem Außenmeniskus ist dieser 3mal häufiger von Verletzungen betroffen [70].

1.4 Klassifikation von Meniskuläsionen

Bei Meniskusverletzungen werden der Längsriss, der Korbhenkelriss, der Querriss, der Radiärriss und der Horizontalriss unterschieden.

Längsriss



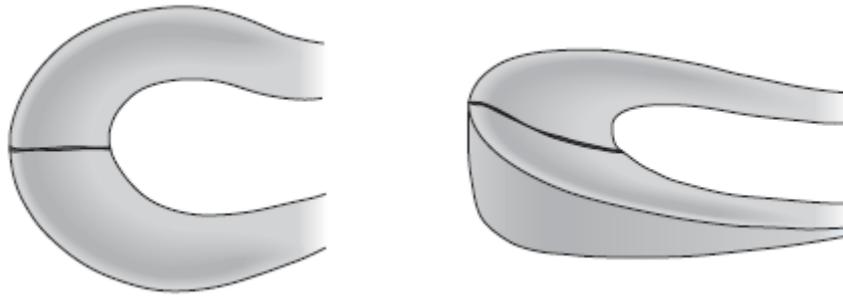
Korbhenkelriss



Querriss



Radiärriß



Horizontalriß

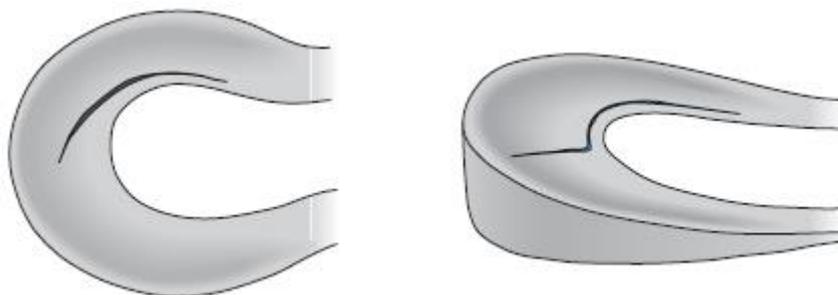


Abb. 1.7 Schematische Darstellungen verschiedener Meniskusläsionen. (Orthopädie und orthopädische Chirurgie 2005, Wirth, Zichner, S. 219)

Prädilektionsstelle des Längsrisses ist das Hinterhorn. Er kann komplett oder inkomplett sein. Inkomplette Risse haben nur Kontakt zu einer Meniskusoberfläche, wohingegen komplette Längsrisse sowohl Ober- als auch Unterfläche des Meniskus betreffen.

Korbhenkelrisse sind Läsionen, die entlang der Meniskusgrenzen verlaufen und dadurch einen inneren Meniskusteil von dem stabileren äußeren Meniskusteil trennen und dabei den inneren Teil ähnlich eines Korbhenkels in das Innere des Gelenks hineinragen lassen. Neben den Radiärrißen sind sie die häufigsten [32].

Querrisse verlaufen senkrecht zu den Meniskusfasern und können ebenfalls komplett oder inkomplett sein.

Ein Radiärriß verläuft von zentral bogenförmig nach peripher.

Beim horizontalen Riss verläuft die Läsion parallel zur Oberfläche bis sie den freien Meniskusrand erreicht.

Die Diagnostik von Meniskuläsionen kann über klinische Untersuchung, konventionelles Röntgen, MRT, Sonografie sowie Arthroskopie erfolgen.

1.5 Therapie von Meniskuläsionen

Läsionen des Meniskus können durch eine partielle Meniskektomie, eine Meniskusnaht, eine Meniskustransplantation oder einen Meniskusersatz behandelt werden.

Nach Jahren, in denen die totale Meniskektomie favorisiert wurde, kam es zu einer Umstellung in der Behandlung der verschiedenen Meniskuläsionen. Grund hierfür war eine mögliche resultierende Gonarthrose. Es wurde nachfolgend versucht, möglichst viel unverletztes Meniskusgewebe zu schonen, um eine stabile und möglichst glatte Restbasis zu erhalten. Diese Eingriffe wurden vermehrt arthroskopisch durchgeführt. Diese Therapie ist auch heute noch im weiß-weißen, avaskulären Bereich, die Operationsmethode der Wahl. Die Behandlung von Läsionen in der avaskulären Zone, welche mit 70% die häufigsten Meniskuläsionen darstellen, war bislang die partielle Meniskektomie [33].

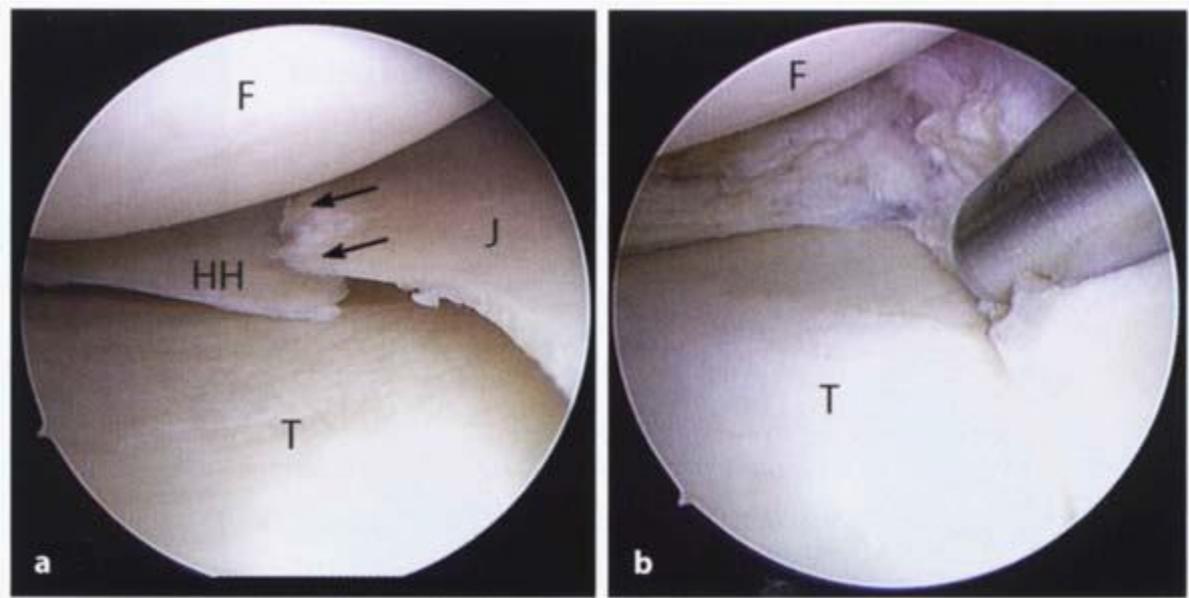


Abbildung 1.8: a: arthroskopisches Bild eines radiären Innenmeniskusrisses (F: mediale Femurkondyle, T: mediales Tibiaplateau, HH: Innenmeniskushinterhorn), b: Bild nach arthroskopisch durchgeführter partieller Meniskusresektion mittels Shaver. (Arthroskopische Chirurgie 1998, Strobel, S. 162, 164)

Befindet sich der Riss in der gut durchbluteten äußeren Zone, der rot-roten Zone, kann eine Refixation mittels einer Meniskusnaht erfolgen [41].

Die Erfolgsaussichten liegen bei einer primären Meniskusnaht in dem äußeren, durchbluteten Teil des Meniskus bei 80-90% [42]. Diese Methode kann auch in der rot-weißen Zone durchgeführt werden, in der avaskulären Zone allerdings nicht [43]. Zellen der avaskulären Zone besitzen nicht die Fähigkeit, eine intrinsische Reparatur durchzuführen [72]. Läsionen in der weiß-weißen Zone brauchen hierzu eine Kommunikation zu dem peripheren Blutsystem [19]. Dies kann sowohl durch einen Trepanationskanal als auch durch Anrauen der Defektränder geschehen, wodurch ein Kontakt zur vaskularisierten Zone geschaffen wird [41]. Es finden sich jedoch im gesamten Meniskus pluripotente Zellen, welche in der Lage wären, eine Reparatur durchzuführen [73]. Spindler et al. zeigten Unterschiede bezüglich der vorhandenen Zellen im Meniskus auf. So haben Zellen in der Tiefe des Meniskus ein schnelleres Wachstum als Zellen auf der Oberfläche der Menisken oder Zellen in der inneren Zone [74]. Hierdurch kommt es zum Einwandern von Zellen und Gefäßen von der äußeren zur inneren Zone des Meniskus [44][45][46].

Läsionen im Bereich des Vorderhorns oder der Pars intermedia können mittels einer arthroskopischen Meniskusnaht in der Outside-in-Technik [47][48][49] oder Inside-out-

Technik [50][51] erfolgen. Hinterhorn- und Korbhenkelrisse werden bevorzugt in All-inside-Technik versorgt [52][53]. Verwendet wird bevorzugt resorbierbares Fadenmaterial der Stärke 2,0. Eine langfristige Überlegenheit der Meniskusnähte gegenüber der partiellen Meniskektomie ist bisher noch nicht belegt.

Bei großflächigem Meniskusverlust mit weiterhin vorhandener Basis kann ein Meniskusersatz mittels Einnähen von zellfreiem Biomaterial erfolgen. Beispiele hierfür sind das Collagen Meniscus Implantat (CMI) oder das Actifit. Ziel hierbei ist das Bereitstellen eines Gerüsts, in das neues Gewebe einwachsen kann.

Bei komplettem Meniskusverlust und somit einem Verlust der Meniskusbasis bedient man sich in seltenen Fällen der allogenen Meniskustransplantation.

1.6 Regeneration von Meniskusdefekten mittels Tissue Engineering

Ein neuer Ansatz zur Behandlung von Meniskusläsionen stellt das Tissue Engineering dar. Hierbei wird in vitro ein Reparaturgewebe erzeugt. Dieses Reparaturgewebe hat die Aufgabe, den Defekt zu heilen, teilweise zu rekonstruieren oder in seiner Funktion zu unterstützen. Im Jahre 1988 wurde im Rahmen der ersten Konferenz zu Tissue Engineering in Lake Tahoe, Kalifornien, die Definition des Tissue Engineering geprägt.

„Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“ (Skalak 1988).

Das Tissue Engineering befasst sich mit der Entwicklung eines Biomaterials, welches die Geweberegeneration mittels Reparaturzellen erleichtern soll. Diese Reparaturzellen können entweder aus den Wundrändern stammen oder ex vivo eingesetzt werden. In der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Universität Regensburg wurde im Rahmen der Biomaterialforschung ein neues biodegradables Biomaterial mit guter Biokompatibilität und spezifischen biologischen Eigenschaften hergestellt, welche auf die Meniskusreparatur abgestimmt wurde [138][139][140][141][142].

Laut Freed[87] sollte eine Matrix zur Meniskusreparatur folgende Eigenschaften haben:

- Reproduzierbare Größe der dreidimensionalen Matrix
- Porosität über 90%, um eine große Oberfläche für die Zell-Polymer-Interaktion und zudem genügend Platz für produzierte extramedulläre Matrix zu bieten.
- Eine Oberfläche, die die Zelladhäsion zulässt.
- Eine vollständige Resorption nach Ausbildung des gezüchteten Gewebes.
- Ein Gleichgewicht von Materialdegradation und Geweberegeneration.
- Polymere und deren Degradationsprodukte dürfen keine Entzündung hervorrufen oder toxisch sein.

Wird ein langsam degradables, poröses Polyurethan-Trägermaterial in einen Defekt der rot-weißen Zone eingebracht, kommt es zu einem verbesserten Heilungsverhalten [85][86][120][121]. Das eingebrachte Implantat ermöglicht das Einwachsen von vaskularisiertem Gewebe mit nachfolgender Differenzierung in fibrocartilaginäres Gewebe. Im Gegensatz hierzu wurden behandelte Kontrolldefekte nur mit fibrösem Material ausgefüllt [120][85]. Bei diesem Trägermaterial trat die fibrocartilaginäre Differenzierung nach mehr als 20 Wochen ein, das Implantat selbst wies ein Degradationsverhalten mit einer Halbwertszeit von mehr als einem Jahr auf [121][85].

Die Matrices können in synthetische und natürliche Matrices unterschieden werden. Bei Verwendung von synthetischen Matrices kam es zur Ausbildung von Gelenkknorpelschäden und kaum einem Einsprossen von natürlichem Gewebe [116][122][119].

Bei Polyurethan als Matrixmaterial wurden Defekte der avaskulären Zone mit Kollagen I und II-haltigem Gewebe ausgefüllt, wenn der Defekt durch eine Inzision Verbindung zur vaskularisierten Zone hatte. Das Gewebe, welches sich gebildet hat, war zwar fibrocartilaginär [86], der Substanzverlust an originärem Meniskus durch die Inzision und der Stabilitätsverlust durch Verletzung an der Meniskusbasis allerdings groß. Auch bei Polyurethan kam es zu osteoarthrotischen Veränderungen und als weiterer negativer Effekt konnte festgestellt werden, dass bei der Degradation des Polyurethans toxische Stoffe freigesetzt wurden.

Biodegradable Materialien zeigten im Vergleich zu synthetischen Materialien bessere Ergebnisse, die biomechanische Evaluierung des Reparaturgewebes fehlte jedoch [124][125]. Ein Einwachsen von Gefäßen nach der Transplantation von Periost oder Synovialis fand nicht statt [42]. Bei Periost zeigte sich die Entwicklung von hyalinem Knorpel und Knochen

[126]. Bei Perichondrium bildete sich ein instabiles und nicht belastbares Gewebe [127]. Kollagen ist die am meisten untersuchte und vielversprechendste Substanz zur Herstellung von Matrices. Im Tiermodell konnten bei Kollagen-Matrices keine Arthrosezeichen am hyalinen Knorpel beobachtet werden [128][129]. Aufgrund ihrer Löslichkeit und ihrem zu schnellen Degradationsverhalten waren natürliche Polymere in ihrem Einsatz als Gewebeersatzmaterial limitiert [130]. Dies führte zur vermehrten Verwendung von Derivaten der extrazellulären Matrix, besonders von Kollagen und Glykosaminoglykanen, welche zur Defektreparatur verwendet wurden. Implantate auf Kollagenbasis, die zur Stabilisierung eine chemische Modifikation mit Glutaraldehyd erfuhren, zeigten sowohl in vitro das Einwachsen von Fibrochondrozyten aus dem umliegenden Meniskusgewebe [131][132] als auch in vivo die Reparatur eines Meniskusdefektes nach subtotaler Meniskektomie [129][133]. Trotz der zufrieden stellenden Ergebnisse von Kollagen-Derivaten wurden Bedenken aufgrund der potentiell toxischen Matrixstabilisatoren wie z.B. des Glutaraldehyds geäußert [121][134].

Das Gewebe mit den besten Ergebnissen bezüglich der fibroartilaginären Differenzierung brachte eine Mischung aus Gelatine und veresterter Hyaluronsäure, beides Derivate aus der extrazellulären Matrix von Meniskusgewebe. Die Derivatisation der Grundkomponente verhindert einen zu schnellen Abbau durch körpereigene Enzyme und stellt damit eine gewisse Anfangsstabilität für die Bildung des Reparaturgewebes dar. Da die Benzylderivate erst verzögert nach zwei bis drei Monaten hydrolysieren, wird eine Degradation der Matrix erst stattfinden, wenn das gebildete Reparaturgewebe die Stabilisierungsfunktion übernehmen kann. Die freigesetzten Degradationsprodukte sind natürlich vorkommende Stoffe extrazellulärer Matrix, die die Regeneration unterstützen können. Weder die Einzelkomponenten noch die Kompositmatrix zeigten Anzeichen einer Toxizität oder einer inflammatorischen Reaktion [140][143][144].

Des Weiteren spielen die zwei Hauptkomponenten des Biomaterials, die Hyaluronsäure und das Kollagen I, eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung, weshalb die Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix ein geeignetes Implantat darstellen könnte, um Zellwachstum und -differenzierung in diesem embryonalen Milieu erlauben zu können [145][146][147][148][149][150]. Versuche mit mesenchymalen Stammzellen wurden bereits durchgeführt. Diese können in Kombination mit chondroinduktiven Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), Insulin-like-Growth Factor-1 (IGF-1) und anderen bioaktiven Faktoren [152][153] sowohl als Aggregate [152] als auch in den Matrices [140][154] zu meniskusartigem Reparaturgewebe [126][136] ausdifferenziert werden. Es

konnte gezeigt werden, dass mit mesenchymalen Stammzellen oder Meniskuszellen beladene Matrices ein besseres Reparaturergebnis hatten als nicht beladene Matrices oder leere Defekte, bei welchen sich jeweils ein fibröses Gewebe bildete. Die Vorbehandlung der mesenchymalen Stammzellen spielt eine entscheidende Rolle. Keine Vorkultur der Stammzellen zeigt im in vivo Experiment gegenüber einer Vorkultur die besseren Ergebnisse im Hinblick auf die Integration des Meniskusreparaturgewebes im Defektareal [167]. Das eingebrachte Konstrukt ist kein abgeschlossenes Knorpelstück, sondern verfügt noch über die Fähigkeit der Zell-Zell-Interaktion und somit zur Einheilung. Im synovialen Milieu kam es zur Reparatur, auch ohne zugegebene Wachstumsfaktoren.

In der Differenzierungszeit der Zell-Matrixkonstrukte können diesen Wachstumsfaktoren hinzugeführt werden, welche die Zelldifferenzierung und Chondrozytenproliferation fördern. Diese können einerseits in anabole (TGF- β 1, BMPs, IGF-I, FGF, VEGF und PDGF-AB) und andererseits in katabole (Endostatin, IL-1 und TNF-alpha) Wachstumsfaktoren unterschieden werden. Ein diffuses Einbringen von Wachstumsfaktoren, wie in einem Fibringerinnsel enthalten, zeigte keine zufriedenstellende Defektheilung. Die Auffüllung eines avaskulären Defektes mit exogen eingebrachtem Fibringerinnsel brachte die Ausbildung eines fibrocartilaginären Reparaturgewebes hervor, welches allerdings makroskopisch und histologisch starke Abweichungen von normalem Meniskusgewebe erkennen ließ [76]. Auch in biomechanischen Testverfahren zeigte sich eine herabgesetzte Belastbarkeit dieses Reparaturgewebes [136]. Auch die Zugabe von kultivierten Knochenmarksstammzellen konnte die Ergebnisse dieses Reparaturgewebes gegenüber einer Meniskusnaht nicht signifikant verbessern [136]. Das Anrauen der Defektränder ergab im Vergleich zum Einsatz von Fibringerinnseln bessere Ergebnisse [49][76][137]. Die Behandlung eines Defektes in der avaskulären, weiß-weißen Zone, konnte mittels eines Trepanationskanals [41], eines eingenähten, gestielten Synoviallappens [135] oder durch Anfrischen vaskulären Pannusgewebes der benachbarten Synovialmembran erfolgen [42]. Diese Methoden ermöglichten die Auffüllung des Defektes in der avaskulären Zone mit fibrösem Bindegewebe, die Auffüllung mit meniskusähnlichem Gewebe war nicht möglich.

Bezüglich der Porengröße einer Matrix wurde die Größe zwischen 150 μ m und 500 μ m als am geeignetsten angesehen [123]. Kleinere Poren erlauben das Einwachsen von fibrösem Gewebe nicht.

1.7 Zytokinetische Vorgänge einer Meniskuläsion

Die Lokalisation des Defektes ist entscheidend, da das Reparationspotential von der Gefäßversorgung abhängt.

Risse in der avaskulären Zone zeigen ein nur geringes endogenes Reparaturpotential, in der gut vaskularisierten peripheren Zone dagegen ein stärkeres. Das Tissue Engineering kann allerdings auch bei Läsionen angewandt werden, wenn der Riss die vaskuläre Zone mit einschließt [41][76][77][78]. Somit kann eine Reparatur mittels Tissue Engineering bei Läsionen in der avaskulären Zone erfolgen, wenn Trepanationskanäle zur vaskularisierten Zone angelegt werden. Läsionen in der rein avaskulären Zone zeigen kein endogenes Reparationspotential, mit Verbindung zur vaskularisierten Meniskuszone allerdings schon [79][21]. Man geht davon aus, dass die putativen Reparaturzellen, mesenchymale Stammzellen aus dem Synovialgewebe oder dem Gefäßsystem, nur bei Kontakt des Gefäßsystems zum Defektareal in dieses einwandern können [80][81]. Analog eines gewebefremden Reparaturmechanismus wandern hierbei Entzündungszellen ein und fördern die Einsprossung von Gefäßen. Im weiteren Remodelling-Prozess bildet sich ein Narbengewebe aus, welches nur eingeschränkt suffizient ist. In manchen Fällen kann sich hierbei auch ein meniskusähnliches Gewebe bilden, was sich dadurch erklärt, dass über den Blutweg oder das synoviale Gewebe mesenchymale Progenitorzellen in das Läsionsgebiet einwandern und sich dort zu Fibrochondrozyten differenzieren und mit der Bildung von meniskusähnlichem Gewebe beginnen [41][77][80][82]. In der Klinik hat sich diese Methode besonders bei inkompletten oder stabilen Meniskuläsionen bewährt und konnte in experimentellen Studien bestätigt werden [44][45][83]. Dies geschieht bei Vorhandensein von einem geeigneten Milieu, unter dem eine meniskustypische Koll I- und II -haltige Matrix produziert werden kann [84][85][86].

Entscheidender Faktor der Meniskusheilung ist die Vaskularisation. Hauptanteil hierbei hat das Zytokin VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF ist nicht nur bei physiologischen, sondern auch bei pathologischen Geschehnissen im skelettalen Bereich beteiligt. Er spielt bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle, indem er diese induziert. Dieser Wachstumsfaktor, ein vaskulärer Permeabilitätsfaktor, hat neben seiner Funktion als Modulator der Vaskularisation auch Funktion als Modulator bei der enchondralen Ossifikation während der embryonalen Entwicklung [92][93], der Wundheilung [94] und der Frakturheilung [95][96]. VEGF ist zudem für die Chemotaxis der Monozyten verantwortlich

und wirkt gerinnungsfördernd [97]. So wurden hohe Konzentrationen an VEGF in Menisken gefunden, welche sich in einer Heilung befanden. Erhöhte Werte sind außerdem in der Synovialflüssigkeit von rheumatisch veränderten Gelenken [98], bei osteoarthritisch verändertem Knorpel [99] und in degenerativem Sehngewebe [100] zu sehen. VEGF spielt sowohl in der Vaskulogenese als auch in der Angiogenese eine entscheidende Rolle. Hierbei wirkt es auf das Endothel ein, indem es die Teilung und Migration von Endothelzellen stimuliert. VEGF spielt eine zentrale Rolle in der normalen, jedoch auch in der pathologischen Angiogenese. Eine Aktivierung der VEGF/VEGF-Rezeptor-Achse löst verschiedene Abläufe aus: Ein Überleben der Endothelzellen, Mitose, Migration, Differenzierung, Gefäßpermeabilität und Mobilisation der endothelialen Progenitorzellen vom Knochenmark in die periphere Zirkulation. Außerdem wird der VEGF mit malignen Ergüssen in Verbindung gebracht [169][170]. Es gibt verschiedene Isoformen des VEGF, welche sich deutlich in ihren biologischen und biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Die im Namen enthaltene Zahl entspricht der jeweiligen Anzahl an Aminosäuren des VEGF. VEGF121, VEGF145 und VEGF165 werden sezerniert, VEGF189 ist an der Zelloberfläche fest an Heparansulfat gebunden und VEGF206 ist ein integriertes Membranprotein [171]. Die unterschiedliche Expression von VEGF-Isoformen unter Normoxie und Hypoxie weist auf unterschiedliche Funktionen der verschiedenen Isoformen des VEGF hin [172]. VEGF 121 ist dabei die am häufigsten vorkommende Isoform, welche im Meniskus bei einer normobaren Hypoxie ausgeschüttet wird. VEGF 165, 189 und 183 folgen in der Quantität abfallend. Des Weiteren steigen die Isoformen 121 und 165 bereits früher als die Isoformen 189 und 183 bei Hypoxie an. Bei den VEGF-Rezeptoren ist der VEGFR 2 im Meniskus häufiger vorhanden als VEGFR 1 und 3. VEGF-Rezeptoren sind Thyrosinkinaserzeptoren mit unterschiedlichen Aufgaben. Sie erfahren ebenso wie der VEGF eine Hochregulation während Hypoxie [172]. Der VEGFR 1 hat seine Aufgabe in der Stimulation und Aufrechterhaltung der Endothelvorläuferzellen während der Angiogenese. VEGFR 2 ist hauptsächlich an der Oberfläche der Endothelzellen lokalisiert und hat den größten Effekt auf die Angiogenese, während VEGFR 3 verantwortlich für die Entwicklung der Blut- und Lymphgefäße ist [173]. Sowohl in der vaskularisierten als auch in der avaskularisierten Zone des Meniskus werden verschiedene Genexpressionen für Koll I, Koll II, MMP-2, MMP-13 und Aggrecan gefunden. VEGF steigert einerseits die Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMP), die das Gewebe abbauen, andererseits steigert es auch die Expression von Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMP), die die MMPs hemmen [174]. Der Abbau von Gewebe ist entscheidend für eine Angiogenese, da der Abbau ein Einwachsen von Gefäßen ermöglicht

[115]. Dieser Zusammenhang könnte darauf schließen lassen, dass der VEGF durch die Stimulation von MMPs eine Gewebsreparatur unterdrückt, eine Vaskularisation allerdings unterstützt. Nach Stimulation mit den Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- β , FGF und IGF kommt es im gesamten Meniskus zu einem Anstieg der MMP-13-Expression. MMP-13 ist eine Proteinase, welche zum Abbau von Kollagen und Aggrecan sowie anderer Proteoglykane führt [175][176]. MMP-1 sowie MMP-13 sind teilweise ursächlich für das Rupturieren der Kollagen-Tripelhelix [177]. FGF steigert in der vaskularisierten Zone die Expression von MMP-3, in der avaskulären Zone wird MMP-3 von TGF- β stimuliert. MMP-2 wird in der Synovialflüssigkeit nur von IGF hochreguliert [61]. VEGF steigert im Meniskus das MMP-2 [62], welches in hohen Konzentrationen einen antiangiogenetischen Effekt aufweist [63]. Außerdem stimuliert der VEGF in vivo das Angiostatin, ein wichtiges antiangiogenetisches Zytokin, das über die Hemmung der Endothelzellen wirkt [64]. Kollagen II wird im Synovialgebiet von VEGF, in der avaskulären Zone von TGF- β , FGF und IGF hochreguliert. Kollagen I wird dagegen in der avaskulären Zone von IGF, FGF und VEGF hochreguliert. Daraus lässt sich schließen, dass sich der vaskuläre und der avaskuläre Teil des Meniskus in Bezug auf die Reparatur unterscheiden. Auch die Wachstumsfaktoren stimulieren in beiden Meniskusarealen verschiedene Genexpressionen [61]. Interleukine wirken proliferativ auf Fibroblasten und induzieren die Sekretion von Proteasen und weiterer Zytokine [65]. Von den Interleukinen konnte in Meniskuszellen die Interleukine-1 β , -6, -18 nachgewiesen werden [66]. Fibrochondrozyten reagieren auf Mediatoren wie z.B. IL-1 mit einer Synthesesteigerung von Kollagenasen und Proteoglykanasen [20]. Interleukin-1 β fördert die Synthese von Kollagen in Fibroblasten [67]. Interleukin-6 wird sowohl in Fibroblasten als auch in Makrophagen synthetisiert und wirkt immunstimulierend [151]. Interleukin-18 gehört zur IL-1 Familie und wirkt ebenfalls proinflammatorisch [103].

Die Qualität der Defektheilung ist von vielen Faktoren abhängig wie z.B. dem verwendeten Zellmaterial, den mechanischen und biologischen Eigenschaften der Trägermatrix [87][88] sowie den verwendeten Wachstumsfaktoren [89]. IGF-I steigert seinerseits die Matrixbiosynthese, die mitogene Aktivität der Chondrozyten und senkt den Matrixkatabolismus. Das IGF-I ist in akuten Knorpeldefekten [155] und in osteoarthritischen Gelenken [156][157] in höherer Konzentration vorhanden [89][158].

TGF- β 1 ist für die Mehrproduktion von großen, anionischen Proteoglykanen verantwortlich. Eine erhöhte Konzentration des TGF- β 1 findet man in der Synovialflüssigkeit von immobilisierten Knien [159][160][161]. Auch im embryonalen Knorpel ist dieser

Wachstumsfaktor nachzuweisen und scheint auch dort eine Rolle in der chondrogenen Differenzierung zu spielen [162]. Dieser Wachstumsfaktor induziert bei Synovialzellen in vitro eine chondrogene Differenzierung [163] und verhindert Hypertrophie [164]. TGF- β steigert dosisabhängig die Proteoglykansynthese der Fibrochondrozyten des gesamten Meniskus [165][166].

Nach Implantation eines Tissue-engineertem Reparaturgewebes bedarf dieses in vivo weiterhin der Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Dies geschieht zum einen über die Synovialflüssigkeit, zum anderen über die Neubildung von Mikrogefäßen. Für die Erhaltung des Reparaturgewebes ist eine suffiziente Angiogenese entscheidend. Sie wird von einer Vielzahl angiogenesefördernder und -hemmender Peptide reguliert, welche auf eindringende endotheliale und glatte Muskelzellen einwirken [90]. Die endogene Hemmung der Angiogenese ist für Gewebe wichtig, die größtenteils avaskulär sind. Diese Hemmung kann einerseits durch Bildung von angiogenesehemmenden Faktoren oder durch die verminderte Ausschüttung von angiogenesefördernder Faktoren erfolgen [91]. Es sind verschiedene endogene Hemmer der Angiogenese bekannt. Diese sind der Plättchenfaktor 4 [104], Interferon- α [105], MMP-2 [63] Thrombospondin [106], Metastatin [107], Troponin I [108], Angiostatin [109][64] und Endostatin [110]. Endostatin/Collagen XVIII ist im avaskulären Teil höher exprimiert als im äußeren vaskulären Teil [111]. Das 20 kDa große Endostatin hindert die VEGF-abhängige Endothelzellmigration [112], die VEGF-vermittelte Neovaskularisation [113] und die VEGF-veranlasste Gefäßpermeabilität [113].

Die endogene Reparatur ist im vaskularisierten Gewebe nur eingeschränkt, im avaskulären Gewebe ausgeschlossen. Petersen et al. versuchten eine Vaskularisierung eines avaskulären Defektes mittels einer lokalen Applikation von VEGF durchzuführen. Hierbei wurde der für den Defekt verwendete Faden zunächst mit PDLLA [poly-(d,l-lactide)acid] und dann mit VEGF beschichtet. Es zeigte sich keine Förderung der Meniskusheilung und führte damit zu dem Schluss, dass Wachstumsfaktoren nicht immer ein vielversprechendes Hilfsmittel für Gewebereparatur darstellen [114]. Es konnten immerhin einzelne Endothelzellen nachgewiesen werden, jedoch keine Angiogenese [114]. Als mögliche Ursache hierfür kann die zu kurze Dauer der VEGF-Bereitstellung durch den mit PDLLA-beschichteten Faden oder die falsche Dosis für eine Meniskusheilung angesehen werden.

Auch eine Kombination des VEGF mit anderen Wachstumsfaktoren könnte die gewünschte Angiogenese verwirklichen [115]. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass eine

Kombination von VEGF und Angiopoetin-1 zwar mehr Gefäße hervorbrachte, die allerdings weniger permeabel waren [115].

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Nach Etablierung der geeigneten Trägermatrix sowie des optimalen Differenzierungsmediums für die Meniskusregeneration war es nun Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkung des unterschiedlichen Differenzierungsgrads im Laufe der chondrogenen Differenzierung auf die Sekretion von VEGF zu ermitteln. Untersucht wurden hierbei mesenchymale Stammzellen (MSCs), Meniskuszellen separat aus dem vaskulären bzw. aus dem avaskulären Bereich sowie Meniskuszellen, gemischt aus der vaskulären und avaskulären Zone humanen Ursprungs und auch vom Kaninchen.

Die VEGF-Sekretion sollte im Mediumüberstand mittels ELISA ermittelt werden und die chondrogene Differenzierungsleistung makroskopisch sowie anhand von histologischen und immunhistochemischen Analysen überprüft werden.

Wir stellten die Hypothese auf, dass sich die VEGF-Sekretion von Aggregaten aus humanen Meniskuszellen aus dem vaskulären und dem avaskulären Bereich, von gemischt avaskulär-vaskulären Meniskuszellaggregaten und von Zellaggregaten aus mesenchymalen Stammzellen voneinander unterscheiden.

Weiterhin postulierten wir, dass humane Meniskuszellen und mesenchymale Stammzellen ein ähnliches VEGF-Sekretionsmuster über den Zeitraum der chondrogenen Differenzierung zeigen würden wie entsprechende Zellen vom Kaninchen.

Die dritte Hypothese lautete, dass Konstrukte aus Meniskuszellen bzw. mesenchymalen Stammzellen vom Kaninchen und einer Matrix auf Gelatine-Hyaluronsäurebasis Unterschiede in der VEGF-Produktion zeigen würden.

Zuletzt sollte untersucht werden, wie sich das Einsetzen eines derartigen Zell-Matrix-Konstrukts in einen Meniskusring als Defekt-Modell in-vitro auswirken würde.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte:

Analysenwaage Kern 770	Kern, Balingen-Frommern
Brutschrank CO2 Heracell 240	Thermo Scientific, Bonn
Digitalfotokamera 5700	Nikon, Düsseldorf
Genios-Photometer	Tecan, Crailsheim
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Kühlschrank Premium frost free	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborwaage Kern EW 4200	Kern, Balingen-Frommern
Melatronic 23 Autoklav	Melag, Berlin
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Fluovert FU	Leitz, Wetzlar
Mikroskopkamera digital Polaroid	Polaroid, Offenbach
Mikroskopkamera DMC2	Polaroid, Offenbach
Millipore Reinstwasseranlage	Millipore, Billerica, MA
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
pH-Meter	Knick, Berlin
Pipetten, Costar Stripette (5, 10, 25, 50ml)	Corning, Corning USA
Schnittehalterung	Thermo Scientific, Bonn
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen

Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Tiefkühltruhe -80°C	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex, Berlin
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wippe für Objektträger	Eigenbau, Werkstatt
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 3S	Heraeus, Hanau
Zentrifuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400	G-Kisker, Steinfurt

Verbrauchsmaterial:

BD Discadit Spritzen	Becton Dickinson, Spain
Braunovidon-Salbe	Braun, Melsungen
Biopsie-Stanzen 2mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Butterfly-Kanüle	Braun, Melsungen
Cups (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (24×32mm, 24×40mm, 24×50mm)	Roth, Karlsruhe
Desinfektionsmittel 2-Propanol 70%	Braun, Melsungen
Desinfektionsmittel Cutasept F	Bode, Hamburg
Einwegspritzen (5,10,50ml)	Braun, Melsungen
Fäden Prolene 4-0	Ethicon, Norderstedt

Fäden Vicryl 3-0	Ethicon, Norderstedt
Kanülen (18G, 20G)	Braun, Melsungen
Kompressen (7,5x7,5cm)	Hartmann, Heidenheim
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Lochtücher	Foliodrape Hartmann, Heidenheim
Neoject Einmalkanülen	Dispomed, Gelnhausen
OP-Besteck	Aesculap Braun, Melsungen
OP-Hauben	Mölnlycke, Erkrath-Unterfeldhaus
Parafilm „M“ Verschlussfolie	Packing Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteur-Pipetten Glas 230mm	VWR Int., Darmstadt
Pipetten (5, 10, 25, 50ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10,100,1000µl)	Biozym Scientific, Oldenburg
Pipettenspitzen ep tips filter (10, 100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Rasierklingen	Personna American Safety Razor Company, Verona,USA
Skalpelle Nr.11, Nr.22	Feather, Köln
Star-Frost-Objektträger	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
Sterile OP-Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Sterilfilter 0,2µm, 0,4µm	Sartorius, Göttingen
Pagasling Tupfer	Hartmann, Heidenheim
Verdauöröhrchen 8,5mm	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon BD, Heidelberg

Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Falcon BD, Heidelberg
Zellkulturschale (24-well, 96-well)	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturschalen (100 mm)	Falcon BD, Heidelberg
Zellkultur-V-Platten (96-well)	Nunc, Rochester

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Merck, Darmstadt
2-Propanol 70% (v/v)	Braun, Melsungen
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Albumin, bovine (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Biotin	Jackson, West Grove, USA
Chromalaun	Sigma Aldrich, Steinheim
Citronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt
D(+) - Saccharose	Roth, Karlsruhe
DePeX	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Diaminobenzidine 3,3'(DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylarsinsäure (DMA)	Sigma Aldrich, Steinheim
1,9-Dimethyl-Methylenblau (DMMB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS (1X)	PAA Laboratories GMBH, Pasching, Austria

Essigsäure	Merck, Darmstadt
FCS	Gibco, Karlsruhe
Fibroblast growth factor	R+D Systems, Wiesbaden
Flüssigstickstoff	Linde, München
Gelatine from porcine Typ A	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ni/Co Stamm	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin	Fluka, Buchs, Schweiz
Propanol	Merck, Darmstadt
Stop Solution	Chondrex, Redmond, USA
Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
TRIS-base	Roth, Karlsruhe
TRIS-Puffer (0,2M) mit	
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin 1% EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt

2.1.3 Antikörper und Enzyme

Anti-Collagen Typ1 Mouse IgG	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Collagen Typ2 Mouse IgG	Merck, Darmstadt
Biotin-SP-conjugated Affine	
Pure Goat-anti-mouse IgG H+L	Dianova, Hamburg

2.1.4 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Seren

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	
High Glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	
Low Glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco´s PBS (1X)	PAA Laboratories GMBH, Pasching, Austria
Fetal bovine Serum	PAN Biotech GmbH, Milano, Italy
Goat Serum	Dako, Hamburg
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium	Gibco, Karlsruhe

2.1.5 Kits

ABC-Kit	Vectorlabs, Burlingame
Native Type II Collagen Detection Kit	Chondrex Inc, Redmond USA

2.1.6 Adhäsions- und Wachstumsfaktoren

Ascorbat	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason (Stock)	0,00392g Dexamethason in 10ml 100% Ethanol
Dexamethason (Gebrauch)	200 µl Stocklösung, 19,8ml DMEM Low Glucose
Fibroblast growth factor	R+D Systems, Wiesbaden
ITS+3 (Insulin-transferrin-sodium)	Sigma Aldrich, Steinheim
TGF-β1 (Transforming Growth Factor β1)	R+D Systems, Wiesbaden

2.1.7 Puffer und Lösungen

Differenzierungsmedium:

47,75ml Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose, 500µl Ascorbat, 500µl Dexamethason, 500µl ITS+3, 500µl Natriumpyruvat, 250µl TGF-β1

TRIS-puffer 0,2M:

24,228 g TRIS base, 900 ml VE-Wasser, pH mit HCl auf 7,0 einstellen.

Waschpuffer:

1560 ml TRIS-puffer 0,2 M, 4400 ml VE-Wasser, 49,92 g NaCl

Blockingpuffer:

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

McIlvaine-Puffer:

Lösung A: 21g 0,1 M Zitronensäure ad 1000 ml A.d.

Lösung B: 35,6 g 0,2M Na₂HPO₄ ad 1000 ml A.d.

67,8 ml der Lösung A + 32,3 ml der Lösung B

Pepsin-Andaulösung:

1 mg Pepsin in 1 ml McIlvaine-Puffer

ABC-Lösung:

2,5 ml TRIS-puffer 0,1M, 1 Tropfen Lösung A (40µl), 1 Tropfen Lösung B (40µl)

Beide Lösungen aus ABC-Elite-Box

Ni/Co-Stammlösung:

Lösung A: 500 mg NiCl₂, 25 mg CoCl₂, 25 ml H₂O

Lösung B: 50 mg BSA, 25 ml H₂O

Lösung A und Lösung B in gleicher Menge mischen.

DAB-Stammlösung:

Lösung A: 50 mg BSA in 25 ml A.d. lösen

Lösung B: 250 mg DAB in 25 ml A.d. lösen

Lösung A und Lösung B zu gleichen Teilen mischen

DAB-Arbeitslösung:

9000 µl TRIS-Puffer 0,1M, 1000 µl DAB/BSA, 400 µl Ni/Co Stamm, 6 µl H₂O₂ 30%

R+D PBS:

40,0314g NaCl, 1,0066g KCl, 7,21g Na₂HPO₄, 1,021g KH₂PO₄. Diese Chemikalien mit A.d. auf 5 Liter auffüllen und den pH zwischen 7,2 und 7,4 kontrollieren.

Reagent Diluent:

0,5g BSA in 50ml R+D PBS lösen. Lösung mit 0,2 µm Filter und Vakuumpumpe filtrieren.

Capture Antibody:

Verdünnt wird mit R+D PBS auf eine Wirkkonzentration von 1µg/ml

Detection Antibody:

Verdünnt wird mit Reagent Diluent auf eine Wirkkonzentration von 0,1µg/ml

Standard-VEGF-Solution:

Verdünnt wird mit Reagent Diluent auf eine Wirkkonzentration von 2ng/ml

Streptavidin HRP:

Die Wirkkonzentration ist bei einer Mischung von 1:200 erreicht. Verdünnt wird mit Reagent Diluent.

VEGF-ELISA-Waschpuffer:

500ml R+D PBS, 250 µl TWEEN20

Urea hydrogen peroxide:

4,72g Natriumcitrat, 3,36g Zitronensäuremonohydrat, 3,12g MES. Diese Chemikalien mit A.d. auf 40ml auffüllen und mit 40ml Citratpuffer mischen.

TMB-Stock:

120mg TMB, 21mg TBABH, 10g flüssiges DMA

Gebrauchslösung VEGF-ELISA-TEST:

5ml Urea hydrogen peroxide, 5ml A.d., 200µl TMB-Stock

2.1.8 Medikamente

Heparin	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ketamin 10%	WDT, Garbsen
Pentobarbital (Narcofen)	Merial, Hullbergmoos
Xylazin 2%	Serumwerk Bernburg, Bernburg

2.1.9 Tiere

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

Die Tiere wurden im Tierstall des Uniklinikums Regensburg gehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur humaner mesenchymaler Stammzellen

Nach Einverständnis der jeweiligen Patienten und der Ethikkommission der Universität Regensburg konnten deren mesenchymale Stammzellen zu Forschungszwecken verwendet werden. Bei diesen Patienten wurde eine Knochenmarkspunktion erforderlich, da sie aufgrund einer Wirbelsäulenverletzung eine Spondylodese erhielten.

Im Rahmen der Arbeit konnte auf bereits im Labor gelagerte humane mesenchymale Stammzellen zurückgegriffen werden, welche in flüssigem Stickstoff eingelagert waren.

Die Gewinnung der Zellen geschah mittels einer Aspiration aus dem Beckenkamm der Patienten und diese wurden intraoperativ mit verdünnter Heparinlösung gemischt und im Labor aufgearbeitet. Dem Knochenmarksaspirat wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (low glucose) zugesetzt. Nach einer Aufreinigung durch Zentrifugation über den Ficollgradienten und Zellzahlbestimmung erfolgte die Aufnahme der Zellen in serumhaltiges DMEM-LG (10% FBS), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer und die darauffolgende Überführung von jeweils 200000 Zellen in eine Kulturflasche, um nun bei 37°C und 5% CO₂ Konzentration wasserdampfgesättigt zu proliferieren. Der Mediumwechsel fand zweimal wöchentlich statt, bis die adhärenen Zellen eine Konfluenz von 80% erreichten.

2.2.2 Zellkultur humaner Meniskuszellen

Auch bei den humanen Meniskuszellen konnte auf bestehende Vorräte des Labors zurückgegriffen werden. Die Meniskuszellen stammten von Patienten, bei denen ein totalendoprothetischer Gelenkersatz oder eine Meniskusteilresektion erforderlich wurde. Auch hier lagen eine Einverständnisse der Patienten und der Ethikkommission der Universität Regensburg vor.

Nach einer Lagerung von maximal 6 Stunden in einer NaCl-Lösung bei 4°C erfolgte die Weiterverarbeitung der Zellen. Hierbei wurde der Meniskus unter sterilen Bedingungen von meniskusfremdem Gewebe befreit. Danach wurden die Menisken entsprechend der drei Vaskularisationszonen separiert. Eine nachfolgende Zerkleinerung des Meniskus wurde mithilfe eines Skalpells durchgeführt, bei der ein serumfreies RPMI-1640 Medium die

Meniskuszellen vor einer Austrocknung schützte und den Zerkleinerungsvorgang kontrollierter machte. Die Meniskuszellen wurden in eine Andaulösung gebracht und für 16h auf einem Rüttler bei Raumtemperatur belassen. Das Abstoppen der Andaulösung geschah durch Zugabe von RPMI-1640 Medium. Zur Entfernung des Lösungsmittels wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Meniskuszellen in einer Zellkulturflasche mit 15 ml des Proliferationsmediums mit RPMI-1640 Medium 10% FBS (fötale Kälberserum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer bei 37°C mit 5%-iger CO₂-Sättigung sowie einer Wasserdampfsättigung. Ein erstmaliger Mediumwechsel fand nach einer Woche statt; weitere Mediumwechsel erfolgten zweimal wöchentlich mit jeweils 15 ml des Proliferationsmediums bis eine ausreichende Konfluenz der Zellen erkennbar war.

2.2.3 Zellkultur mesenchymaler Stammzellen von New Zealand White Rabbits

Vor der Zellgewinnung wurde die Erlaubnis der Durchführung bei der Ethikkommission der Universität Regensburg eingeholt. Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark am Beckenkamm der New Zealand White Rabbits gewonnen. Hierbei wurden die Kaninchen durch eine gluteale i.m.-Gabe von Ketamin 10% (2,5ml) und Xylazin 2% (2,5ml) narkotisiert. Nach Positionierung der Kaninchen in Bauchlage wurden die Beckenkammregionen rasiert, desinfiziert sowie mit einem Lochtuch steril abgedeckt. Über einen ca. 1cm langen Hautschnitt erfolgte die Darstellung des Beckenkamms. Mit einer 16G Kanüle wurde durch drehende Bohrbewegungen die Eröffnung der Knochenmarkshöhle erreicht. Mit einer heparinisierten 20 ml Spritze konnten durch Aspiration Knochenmarksstammzellen gewonnen werden. Die Knochenmarksgewinnung wurde auf beiden Seiten des Beckenkamms durchgeführt. Abschließend erfolgte die Wundversorgung mittels resorbierbaren Fäden sowie einer Braunovidonsalbenauftragung.

Nach der sterilen Gewinnung folgte unmittelbar darauf die Weiterverarbeitung und Kultivierung. Hierfür wurden die entnommenen Zellen einem Proliferationsmedium, welches sich aus DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium), 10% FBS (fötale Kälberserum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer zusammensetzte, zugesetzt, indem die Zellen in der Spritze durch eine 16 G Nadel in das Kulturmedium gepresst wurden. Dies diente dem Lösen der Zellen untereinander. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1700 rpm konnte

der Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt werden. Nach Zusatz von 25µl der zu bestimmenden Zellsuspension, 100 µl Essigsäure zur Erythrozytenlyse und 75 µl des oben genannten Proliferationsmediums wurde die Zellzahl ermittelt. Zum Auszählen der Zellen kam eine Neubauerzählkammer zum Einsatz. Unter einem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen der Zellsuspension ausgezählt und mittels folgender Formel bestimmt:

$$N = Z * X * V / 10^{-4} \text{ ml}$$

Dabei entsprach Z der gezählten Zellzahl, X dem Verdünnungsfaktor, V dem gesamten Volumen der Zellsuspension in ml und 10^{-4} ml dem Inhalt der Neubauerzählkammer. Nach dem Auszählen der Zellen wurden je $4 * 10^5$ Zellen mit dem Zellkulturmedium versetzt und zur weiteren Kultivierung in eine 75cm^2 Kulturflasche gebracht, welche daraufhin im Brutschrank weiter kultiviert wurden. Der erste Mediumwechsel wurde nach einer Woche und anschließend zweimal wöchentlich durchgeführt.

2.2.4 Zellkultur der Meniskuszellen von New Zealand White Rabbits

Auch hierbei lag eine Einverständniserklärung der Ethikkommission der Universität Regensburg vor. Eine Narkose wurde analog der Knochenmarkspunktion mit i.m.-Gabe von Ketamin und Xylazin erzielt. Die Kaninchen wurden in Rückenlage positioniert und die Kniegelenke des Kaninchens großzügig rasiert und desinfiziert. Nun erfolgte die sterile Abdeckung eines Kniegelenks und dessen Eröffnung mit einem Skalpell. Unter sterilen Bedingungen wurden der Außen- und Innenmeniskus mobilisiert und entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in RPMI-1640 Medium steril bei Raumtemperatur gelagert. Die Meniskusgewinnung erfolgte im kontralateralen Kniegelenk analog. Nach der Meniskusgewinnung wurden die Kaninchen mit einer letalen Dosis von 2 ml Pentobarbital (Narcoren) i.v. eingeschläfert.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Menisken an einer Sterilbank von umliegendem meniskusfremdem Material befreit. Mit einem 22er Skalpell wurden von drei der vier pro Kaninchen gewonnenen Menisken durch einen Längsschnitt in einen inneren, avaskularisierten Teil sowie in einen äußeren, vaskularisierten Teil geteilt. Nach der Trennung wurden jeweils die drei avasculären Meniskusteile und die drei vaskulären Meniskusteile zusammengefügt und getrennt behandelt. Der verbliebene vierte Meniskus wurde nach

Freipräparation von umliegendem Gewebe als Gesamtheit belassen und stellt somit die Zellen der gemischtvaskulären Zone dar.

Die jeweils avaskularisierten, vaskularisierten und gemischtzelligen Meniskusstücke wurden mechanisch mit Skalpellen zerkleinert. Um das Schneiden kontrollierter durchzuführen und einer Austrocknung vorzubeugen, wurde beim Zerkleinern einige Tropfen RPMI-1640 Medium dazugegeben.

Nun wurden die zu ca. 0,5 mm Durchmesser zerkleinerten Meniskusstücke in ein 15ml-Falcon mit darin enthaltener Andaulösung gebracht und diese auf einem Schüttler für 16 Stunden bei Raumtemperatur belassen.

Zum Entfernen der Andaulösung und des Zelldetritus wurde nach den 16 Stunden eine Waschung und Aufbereitung durchgeführt. Hierzu wurde RPMI-1640 Medium in das Falcon zugegeben, die Zellen anschließend durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 2000 rpm von der Flüssigkeit getrennt, welche unter sterilen Bedingungen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt wurde. Die jeweiligen Zellpellets wurden nun in 15 ml Proliferationsmedium resuspendiert, in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und eine Woche in einem Brutschrank bei 37°C, 5%iger CO₂-Sättigung sowie einer Wasserdampfsättigung kultiviert.

Der erste Mediumwechsel erfolgte nach einer Woche, anschließend zweimal wöchentlich mit 15 ml RPMI-1640 Medium, 10% FBS (fötales Kälberserum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Hepes Puffer.

2.2.5 Gewinnung der jeweiligen Zellart aus den Zellkulturflaschen

Nachdem die jeweiligen Zellen in den Zellkulturflaschen eine 80%-Konfluenz erreicht hatten, konnten sie für den weiteren Gebrauch entnommen werden. Hierfür wurde das in den Zellkulturflaschen befindliche Proliferationsmedium unter sterilen Bedingungen mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Eine zusätzliche Waschung erfolgte durch sterile Zugabe und Absaugung von Dulbecco's PBS. Nun befanden sich in der Flasche nur noch die am Boden adhärenen Zellen, welche sich durch eine Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA vom Boden lösten. Nach ca. 3 Minuten wurde die vollständige Ablösung der Zellen durch Mikroskopie kontrolliert. Das Trypsin wurde durch Hinzufügen von 5ml des jeweiligen Proliferationsmediums inhibiert.

Die nun in den jeweiligen Flaschen befindlichen 6ml Lösung wurden mit Hilfe von Eppendorfpipetten in ein 50ml Falcon überführt. Durch ein 10-minütiges Zentrifugieren mit 1000 rpm konnten die Zellen durch Absaugen mit einer Vakuumpumpe von dem Trypsin/Proliferationsmedium-Gemisch abgetrennt werden.

2.2.6 Auszählen der abtrypsinierten Zellen

Bei Meniskuszellen erfolgte das Auszählen der Zellen im Gegensatz zu mesenchymalen Stammzellen, wie oben beschrieben, mittels des entsprechenden Proliferationsmediums. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit dem jeweiligen Proliferationsmedium versetzt. Die Menge des zugeführten Proliferationsmediums, bei Meniskuszellen RPMI-1640 Medium mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer, bei MSC serumhaltiges DMEM-LG (10% FBS) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% HEPES Puffer, errechnete sich dadurch, dass pro abtrypsiniertes konfluente Zellkulturflasche eine Menge von 1 ml dem 50ml Eppendorf Falcon zugegeben wurde. Zur Auszählung der Meniskuszellen wurden 20µl des resuspendierten Zell/Proliferationsmedium Gemisches zur Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen mit 20µl Trypanblau vermischt und in die Neubauerzählkammer gebracht. Hier erfolgt das Auszählen der Zellen analog dem o.g. mikroskopischen Auszählverfahren.

Wenn nach dem Auszählen zu wenig Zellen für die Weiterverarbeitung vorhanden, konnten die jeweiligen Zelllinien erneut einer Proliferationsphase zugeführt werden, bei der wiederum 200000 Meniskuszellen bzw. 400000 mesenchymale Stammzellen pro Zellkulturflasche ausgesät wurden.

2.2.7 Anlegen von Zellaggregaten

Für die jeweiligen humanen und vom Kaninchen stammende Zellarten, also vaskuläre, avaskuläre und gemischtvaskuläre Meniskuszellen sowie die mesenchymalen Stammzellen, wurden 3D-Kulturen hergestellt, welche im Folgenden Aggregate genannt werden. Hierbei bestand ein Aggregat aus Meniskuszellen aus 200000 Zellen, ein Aggregat mesenchymaler Stammzellen aufgrund ihrer geringeren Größe aus 400000 Zellen. Nach Auszählen der jeweiligen Zellarten der 50ml Falcons wurde den Falcons ca. 20 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose zugegeben und bei 1000 rpm für 10 Minuten

zentrifugiert und schließlich der Überstand mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Nach Auszählen der Zellen konnte die Anzahl der Aggregate berechnet werden. Pro Aggregat ist ein Differenzierungsmedium von 300 µl vorgesehen. Das Differenzierungsmedium besteht aus DMEM high-glucose-Medium, 1% Pyruvat, 1% ITS+3, 1% Dexamethason, 1% Ascorbinsäure und 0,5% TGF-β1. Die Menge an zugegebenem Differenzierungsmedium ergab sich aus der Anzahl der Aggregate, die aus der jeweiligen Zellzahl hergestellt werden konnte. Das Differenzierungsmedium wurde den jeweiligen Zellen im Falcon zugegeben und resuspendiert. Nun wurde jeweils 300 µl der Zellsuspension mittels einer Multipette in je ein well der 96-well-V-Platte pipettiert. Die Platte wurde bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren bildeten sich Pellets am Boden der Vertiefungen der 96-well-Platte, die 300 µl Differenzierungsmedium verblieben. Das Differenzierungsmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt und das verbrauchte Medium für einen späteren VEGF-ELISA gesammelt und bei -80°C gelagert. An Tag 1,7,14 und 21 der 21-tägigen Differenzierungszeit erfolgte jeweils die Entnahme einiger Aggregate für immunhistochemische Färbungen.

2.2.8 Beimpfen der Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrices mit Zellen

Nachdem die Zellen in den Zellkulturflaschen eine 80%ige Konfluenz erreicht hatten, erfolgte das Abtrypsinieren und Auszählen in oben beschriebender Methodik. Pro Matrix waren eine Million Zellen vorgesehen. Die abzentrifugierten Zellpellets wurden in einer Zelldichte von 4 Mio. Zellen mit 100µl des Differenzierungsmediums resuspendiert. Das Beimpfen der Matrices erfolgte unter sterilen Bedingungen mittels Pinzetten und einer selbst konstruierten Kanülvorrichtung, die auf die Eppendorf-Pipette montiert werden konnte. Nach der Beimpfung der Matrices mit 25µl wurden diese in die zentral gelegenen wells einer 24-well-Zellkulturschale gegeben. In die peripher gelegenen wells wurde Dulbecco's PBS hinzugegeben, um die Matrices vor einer Austrocknung zu schützen. Eine Adhäsion der Zellen erfolgte durch eine 90-minütige Lagerung der Platten im Brutschrank. Hiernach wurden die mit Zellen beladenen Matrices steril in neue 24-well-Zellkulturschalen überführt und zu jeder Matrix in einem well je 1 ml des Differenzierungsmediums gegeben. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Das gewechselte Medium wurde für ELISA-Tests jeweils in der -80°C-Truhe gelagert. Um Auswirkungen einer Vordifferenzierung nachzuweisen, wurden die Zell-Matrix-Konstrukte zwei unterschiedlichen Gruppen

zugeführt. Bei einem Teil wurde nur die Differenzierungszeit von drei Wochen durchgeführt. Ein anderer Teil der Zell-Matrix-Konstrukte erhielt vor der eigentlichen dreiwöchigen Differenzierung noch eine zweiwöchige Vordifferenzierung; hatte somit eine Differenzierungszeit von fünf Wochen.



Abb. 3.1 Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix in Aufsicht (Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen, Zellner, 2006)

2.2.9 Implantieren der zellbeladenen Matrices in Meniskusstanzdefekte des Kaninchens

Nach operativer Gewinnung von Menisken des Kaninchens wurden sowohl Außen- als auch Innenmeniskus radiär in 3 bzw. 2 Meniskusstücke geteilt und jedem Bruchstück ein Meniskusdefekt mittels 2mm-Stanze zugefügt. Der Defekt erstreckte sich sowohl in der rot-weißen als auch in der weiß-weißen Zone. Nun erfolgte die Gewichtsbestimmung der einzelnen Meniskusstücke mit jeweiligem Leerdefekt. Die zellbeladenen Matrices wurden nun mit Pinzetten in den Defekt eingebracht. Hierbei unterschieden sich die Matrices in ihrer Zellart und in ihrer Vordifferenzierungszeit. Eine Gruppe hatte eine Vordifferenzierung von 1 Tag, die andere von 2 Wochen, die letzte von 5 Wochen. Außerdem wurde eine Gruppe von Meniskusringen mit Leerdefekt belassen und eine weitere Gruppe erhielt eine Leermatrix implantiert, bevor sie der Differenzierungsphase zugeführt wurden.

Diese hergestellten Meniskusstücke wurden in eine 24-well-Zellkulturplatte überführt und einer dreiwöchigen Differenzierung zugeführt. Die Menge des Differenzierungsmediums jedes einzelnen Kontrukts aus zellbeladener Matrix im Meniskusstanzdefekt orientierte sich an dem zuvor jeweils bestimmten Gewicht des jeweiligen Meniskusbruchstückes mit Leerdefekt. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Das gewechselte Medium wurde in der -80°C-Truhe für spätere VEGF-ELISA-Tests gelagert. Eine histologische Auswertung erfolgte am Ende der Differenzierungszeit.

2.2.10 Beschichten der Objektträger vor Aufbringen der histologischen Schnitte

Zur besseren Haftung der histologischen Schnitte wurden die Star-Frost-Objektträger auf der zu verwendeten Seite mit einer Gelatinelösung beschichtet. Diese Lösung bestand aus VE-Wasser aus einer Millipore Reinstwasseranlage, Gelatine from porcine Typ A, Chromalaun und Glutaraldehyd. Zur Herstellung von 50 ml dieser Lösung wurden 49 ml VE-Wasser mit 0,75g Gelatine from porcine Typ A versetzt, wobei sich die Lösung der Gelatine unter leichtem Erwärmen mit einem Gasbrenner beschleunigte. Des Weiteren wurden 1 ml VE-Wasser mit 0,05g Chromalaun versetzt und der wieder auf Raumtemperatur abgekühlten Lösung zugeführt und gemischt. Schließlich wurden 125 µl Glutaraldehyd der Lösung zugegeben.

Zur eigentlichen Beschichtung der Objektträger wurden je 20 µl der hergestellten Gelatine-Lösung auf einen Star-Frost-Objektträger gegeben und mithilfe eines zweiten Objektträgers verstrichen. Hierbei wurden die beiden Objektträger mit ihren Objektseiten aneinandergelagert und so lange verrieben, bis die gesamte Oberfläche beider Träger mit der Lösung benetzt war. Zur Trocknung und Lagerung wurden die beiden Objektträger in einer Objektträgerschatulle eingelagert.

2.2.11 Objektgewinnung für Histologie

Einige Zellaggregate und Zell-Matrix-Konstrukte wurden während ihrer Differenzierung jeweils an den Differenzierungstagen 1,7,14 und 21 entnommen und für die histologische Weiterverarbeitung vorbereitet. Die hergestellten Meniskusringe wurden am Ende der Differenzierungsphase nach 21 Tagen entnommen. Hierzu wurden die Zellaggregate bzw. Zell-Matrix-Konstrukte bzw. Zell-Matrix-Konstrukte im Meniskusdefekt in ein Eppendorf-Cup überführt und von restlichem Differenzierungsmedium getrennt. Anschließend wurden die Objekte in Standardfixans (Paraformaldehyd) überführt. Das Standardfixans verblieb für 1 h auf den Aggregaten, für 2 h auf den Zell-Matrix-Konstrukten und für 4 h auf den Zell-Matrix-Konstrukten im Meniskusdefekt. Eine Auswaschung des Standardfixans erfolgte durch Absaugen und Überführung in Phosphatpuffer. Dieser wurde dann von 10%iger Saccharoselösung ersetzt, welche ebenfalls für 1 h verblieb. Anschließend wurde diese für 1 h durch eine 20%ige Lösung ersetzt, die wiederum durch eine 30%ige Saccharoselösung

ersetzt wurde. Nach Zugabe der 30%igen Saccharoselösung wurden die Objekte bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.2.12 Aufbringen der Zellaggregate, Zell-Matrix-Konstrukte und Zell-Matrix-Konstrukte im Meniskusdefekt auf Objektträger für histologische Auswertung

Die mit 30%iger Saccharose-Lösung gelagerten Materialien wurden für die weitere histologische Verarbeitung mit Tissue-Tec versetzt. Hierzu wurden die Materialien mit einer Mischung aus 200µl 30% Saccharose-Lösung und 200µl Tissue-Tec für mindestens 24h bei 4°C belassen. Eine Durchmischung der Materialien mit den 2 Substanzen erfolgte mit einer Kanüle. Diese Objekte wurden auf den Boden eines quaderförmigen Metallgehäuses gebracht, ihre Anordnung schematisch protokolliert und die Form mit Tissue-Tec aufgefüllt. Anschließend wurden diese Formen mitsamt dem Inhalt in Flüssigstickstoff eingetaucht und das vollständige Einfrieren der Objekte im Tissue-Tec abgewartet. Nach Abtrennen des Metallgehäuses wurden die erhaltenen Blöcke bei -80°C eingelagert.

Von diesen Blöcken wurden Gefrierschnitte von 10-12 µm Dicke hergestellt, die auf beschichtete Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur gelagert wurden.

2.3 Analytik

2.3.1 Fotografie der Zellaggregate sowie der Zell-Matrix-Konstrukte im Meniskusring nach Differenzierung

Vor der Einbettung in Tissue-Tec wurden von den Aggregaten und den Zell-Matrix-Konstrukten im Meniskusring makroskopische Bilder zur Bewertung der Morphologie mittels Fotodokumentation angefertigt.

2.3.2 DMMB (1,9-Dimethyl-Methylenblau)-Färbung

Die Rehydrierung der Objektträger sowie das Auswaschen des Tissue-Tec auf den Objektträgern erfolgte durch Lagerung dieser in Aqua dest. für 5 Minuten. Die Schnitte wurden daraufhin für 5-10 min. in 0,1% DMMB-Lösung eingelegt und gefärbt. Das Auswaschen des überschüssigen DMMB auf den Objektträgern erfolgte durch mehrmaliges Eintauchen dieser in Aqua dest.. Der Wasserentzug erfolgte durch Eintauchen der Objektträger in einer aufsteigenden Propanolreihe (96%, 100%) und abschließend in 100% Xylol. Die Deckgläser wurden mithilfe von Depex auf die Objektträger gebracht.

2.3.3 Immunhistochemische Kollagen I- und II-Färbung

Die Objektträger wurden für 10 Minuten in Waschpuffer rehydriert. Nach Entfernen des Waschpuffers wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einem Gemisch aus Phosphatpuffer, H₂O₂ und Methanol versetzt, um die endogenen Peroxidasen zu blockieren. Nach Auswaschen der Schnitte mit Waschpuffer wurden diese in eine Objektträgerhalterung eingespannt.

Zur Entwirrung des Kollagens wurde eine Pepsinandaulösung für 15 min auf die Objektträger gebracht. Nach einem erneuten Waschschrift wurde Blockingpuffer für insgesamt 60 Minuten auf den Objektträgern belassen, um an unspezifische Bindungsstellen zu binden. Nun wurden die Primärantikörper gegen Kollagen I oder Kollagen II mit Blockingpuffer vermischt und diese Lösung auf die jeweiligen Objektträger gegeben. Als Negativkontrolle diente das

alleinige Aufbringen von Blockingpuffer. Die Objektträger in der Halterung wurden über mindestens 12 Stunden zur Inkubation der Primärantikörper auf eine Wippe gestellt.

Nun erfolgte das dreimalige Waschen der Objektträger mit Waschpuffer. Der Sekundärantikörper, Biotin-SP-conjugated Affine Pure Goat-anti-mouse, wurde in Blockingpuffer gebracht und für 60 Minuten auf die Träger einschließlich der Negativkontrollen zur Inkubation gegeben. Nach nochmals dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die ABC-Lösung für 90 Minuten auf die Objektträger gegeben. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Objektträger aus den Halterungen entnommen, die Entwicklung erfolgte in DAB-Lösung und mit NiCo-Stammlösung als Verstärker. Die Schnitte wurden nach der Entwicklung in Waschpuffer gesammelt und einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten zugeführt. Schließlich wurden Deckgläser mithilfe von Depex auf die Objektträger gebracht.

2.3.4 Mikroskopie der Schnitte

Nach Reinigung der Objektträger erfolgte die Mikroskopie der Schnitte mit einem Mikroskop der Firma Leitz, die Fotodokumentation mit der Mikroskopkamera DMC2 der Firma Polaroid.

2.3.5 VEGF-ELISA-Tests

Sowohl von den humanen als auch von den Kaninchenzellaggregaten, den Zell-Matrix-Konstrukten, den Meniskusringen und den Zell-Matrix-Konstrukten in den Meniskusdefekten wurden während ihrer dreiwöchigen Differenzierungsphase im Rahmen des Mediumwechsels das entnommene Differenzierungsmedium jeweils gesammelt und einem VEGF-ELISA-Test zugeführt. Gemessen wurde das gesamte VEGF, ohne Unterteilung in dessen Isoformen.

Hierbei wurden die wells der 96-well-Zellkulturschalen mit jeweils 100µl Capture Antibody befüllt, mit Parafilm bedeckt und somit geschützt über mindestens 12h bei Zimmertemperatur belassen. Nun erfolgte die dreimalige Waschung mit dem VEGF-ELISA-Waschpuffer. Der nächste Schritt beinhaltete die Befüllung der wells mit 300µl Reagent Diluent und Belassen der Platte für 60 Minuten. Nach Waschen der Platte folgte das Pipettieren der Standard-Verdünnungsreihe. Aufgrund von möglichen Abweichungen wurden im Rahmen der ELISA-

Tests 3 wells mit identischem Material befüllt und für die spätere Auswertung der Mittelwert dieser 3 Messwerte verwendet. Bei den Meniskusdefekten erfolgte eine Zweifach-Bestimmung. Nach der Standard-Verdünnungsreihe erfolgte das Pipettieren des jeweiligen Differenzierungsmediums in ebenfalls verschiedenen Verdünnungen. Es wurden dabei jeweils 100µl pro well verwendet. Die Platte wurde nun für 2 h belassen, bevor sie wieder gewaschen wurde. Vor der nächsten Waschung wurde für 2 h 100µl Detection Antibody zugegeben. Anschließend wurden für 20 Minuten 100µl Streptavidin HRP in die wells gegeben und die wells hierfür unter Lichtausschluss gelagert. Nach diesen 20 Minuten erfolgte der letzte Waschgang. 100µl Gebrauchslösung wurden pro well zugegeben und die Platte für weitere ca. 20 Minuten unter Lichtausschluss belassen. Zuletzt erfolgte das Abstoppen der Reaktion mittels Stop solution und die Auswertung der Platte am Genios-Photometer.

2.3.6 Auswertungen gefärbter humaner Zellaggregate und von VEGF-ELISA-Tests des Differenzierungsmediums humaner Zellaggregate

Für die humanen Zellen wurden von drei verschiedenen Probanden jeweils 20 Aggregate von mesenchymalen Stammzellen angelegt.

Zudem wurden von drei anderen Probanden jeweils 20 Zellaggregate für jeweils vaskuläre und avaskuläre Meniskuszellen angelegt.

Von weiteren drei Probanden wurden jeweils 20 Zellaggregate für gemischtvaskuläre Meniskuszellen angelegt.

Während der Differenzierungsphase wurden an den Tagen 1,7,14,21 jeweils drei Aggregate eines jeden Ansatzes für histologische Untersuchungen entnommen. Die verbliebenen acht Aggregate dienten der Menge an Differenzierungsmedium für die VEGF-ELISA sowie als Rücklage bei Verlust. Die Zellaggregate wurden makroskopisch fotografiert, die Schnitte anschließend mit DMMB und immunhistochemisch für Kollagen I und II angefärbt.

Während der 21-tägigen Differenzierungsphase der humanen Zellaggregate wurde dreimal wöchentlich das Differenzierungsmedium gewechselt. Hierbei wurde das entnommene Differenzierungsmedium eingelagert und einer VEGF-Bestimmung mittels ELISA zugeführt. Verwendet wurde jeweils das Medium, das drei Tage als Differenzierungsmedium der Zellaggregate gedient hat. Die VEGF-ELISA-Tests wurden für jeden Versuchsansatz getrennt

durchgeführt. Die 300µl Differenzierungsmedien der einzelnen Aggregate eines Ansatzes eines Probanden wurden am Entnahmetag zusammengeführt und die Auswertung erfolgte, indem eine Dreifachbestimmung der jeweiligen Probe mittels VEGF-ELISA durchgeführt wurde. Die statistischen Auswertungen der gezeigten Schaubilder entstanden durch Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Patienten am jeweiligen Differenzierungstag.

2.3.7 Auswertungen gefärbter Kaninchenzellaggregate und von VEGF-ELISA-Tests des Differenzierungsmediums der Kaninchenzellaggregate

Analog den humanen Aggregaten wurde auch bei den Kaninchenzellen von 3 verschiedenen Kaninchen vaskuläre, avaskuläre und gemischtvaskuläre Meniskuszellaggregate sowie Aggregate aus mesenchymalen Stammzellen des jeweiligen Kaninchens angelegt. Hierbei diente ein Kaninchen als Spender aller vier Zellarten. Erneut wurden ca. 20 Aggregate je Zellart je Kaninchen hergestellt. Eine immunhistologische Untersuchung erfolgte auch hier durch Entnahme von 3 Aggregaten jeder Zellart an den Tagen 1, 7, 14, 21. Das dreimal wöchentlich gewechselte Differenzierungsmedium der Aggregate wurde in der -80°C Truhe gelagert, für die VEGF-ELISA-Tests wurde das Differenzierungsmedium verwendet, welches drei Tage als Differenzierungsmedium diente. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls analog den humanen Zellaggregaten.

2.3.8 Auswertungen gefärbter Kaninchenzell-Matrixkonstrukte und von VEGF-ELISA-Tests des Differenzierungsmediums der Kaninchenzell-Matrixkonstrukte

Die jeweils vier Zellarten von 3 unterschiedlichen Kaninchen wurden nach entsprechender Proliferationsphase in Gelatine-Hyaluronsäurematrices injiziert. Pro Gelatine-Hyaluronsäurematrix wurden 1 Million Zellen verwendet. Die Differenzierungszeit betrug auch hier 3 Wochen. Eine Hälfte der Konstrukte bekam eine 2-wöchige Vordifferenzierung vor der eigentlichen 3-wöchigen Differenzierungszeit. Pro zellbesetzter Matrix wurde 1ml Differenzierungsmedium zugesetzt, welches dreimal wöchentlich gewechselt wurde. Für die VEGF-ELISA-Tests wurde auch hier das Differenzierungsmedium verwendet, welches für insgesamt drei Tage der Differenzierung diente. Es wurde in einer -80°C-Truhe bis zur

weiteren Analyse eingelagert. Die statistische Auswertung erfolgte analog den Zellaggregaten.

Am Ende der dreiwöchigen Differenzierung wurden sowohl Kaninchenzell-Matrixkonstrukte ohne Vorkultur als auch Konstrukte mit 2-wöchiger Vorkultur einer histologischen Untersuchung unterzogen. Eine histologische Auswertung an Tag 1 diente lediglich dem Nachweis einer erfolgreichen Beimpfung und einer Beurteilung der Zellverteilung.

2.3.9 Auswertung gefärbter Meniskusdefekte alleine sowie mit zellfreien Gelatine-Hyaluronsäure-Matrices und mit Kaninchenzellen beladene Gelatine-Hyaluronsäure-Matrices und von VEGF-ELISA-Tests ihrer Differenzierungsmedien

In diesem Versuchsteil wurde das Zusammenspiel von Zell-Matrix-Konstrukten mit den zuvor hergestellten Meniskusringen untersucht. Hierbei wurde die Integration der Zell-Matrix-Konstrukte im Meniskusring, die Kollagen I- und Kollagen II-Bildung sowie die Produktion von VEGF untersucht. Es wurden Meniskusringe, die nur einen Leerdefekt enthielten, mit Meniskusringen mit zellfreier Matrix sowie Meniskusringe mit zellbesetzten Matrices miteinander verglichen. Die Zellen der zellhaltigen Matrices unterteilten sich in vaskuläre, avaskuläre und gemischtvaskuläre Meniskuszellen sowie in mesenchymale Stammzellen. Die jeweiligen Zellen entstammten einem einzigen Kaninchen. Die Meniskusringe mit zellbeladenen Matrices im Defekt wurden zudem noch in eine Gruppe der zellbesetzten Matrices ohne Vorkultur, eine Gruppe mit einer zweiwöchigen Vorkultur sowie eine Gruppe mit fünfwöchiger Vorkultur vor der eigentlichen dreiwöchigen Differenzierungszeit im Meniskusdefekt unterteilt. Für jede Gruppe wurden jeweils 5 Meniskusringe angelegt.

Das Differenzierungsmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Das Medium, welches drei Tage als Differenzierungsmedium diente, wurde für die VEGF-Bestimmung mittels ELISA verwendet. Im ELISA-Test erfolgte eine Zweifachbestimmung je Meniskusring und Analysezeitpunkt, die statistische Auswertung erfolgte analog den o.g. Methoden. Bei Meniskusringen mit 5-Wochen Vorkultur wurde keine VEGF-Bestimmung durchgeführt, hier wurde speziell auf die Integration und Differenzierung geachtet. Histologische Auswertungen wurden am Ende der Differenzierungszeit angestellt.

2.3.10 Statistik

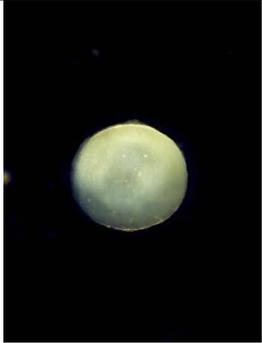
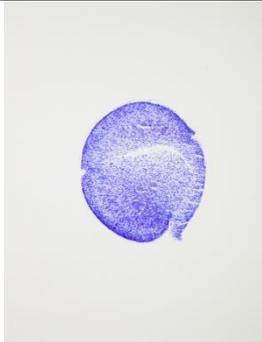
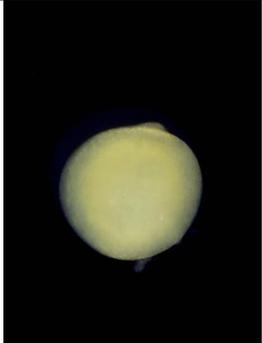
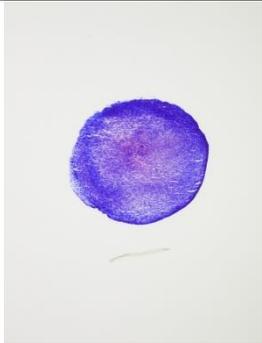
Die Daten werden grafisch durch Säulendiagramme und gruppierte Säulendiagramme präsentiert. Zum Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb der Gruppen wurde der nicht-parametrische Friedman-Test durchgeführt. Falls dieser signifikant war, wurden anschließende post-hoc Paarvergleiche durchgeführt. Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test verwendet. Auch hier wurden bei einem signifikanten Ergebnis post-hoc Paarvergleiche durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde für alle Tests 5% festgelegt. Die Analysen wurden mit SPSS 24.0 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Humane Zellaggregate

3.1.1 Färbungen und VEGF-ELISA-Tests

Zellaggregate mit Zellen der vaskulären Zone

	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				

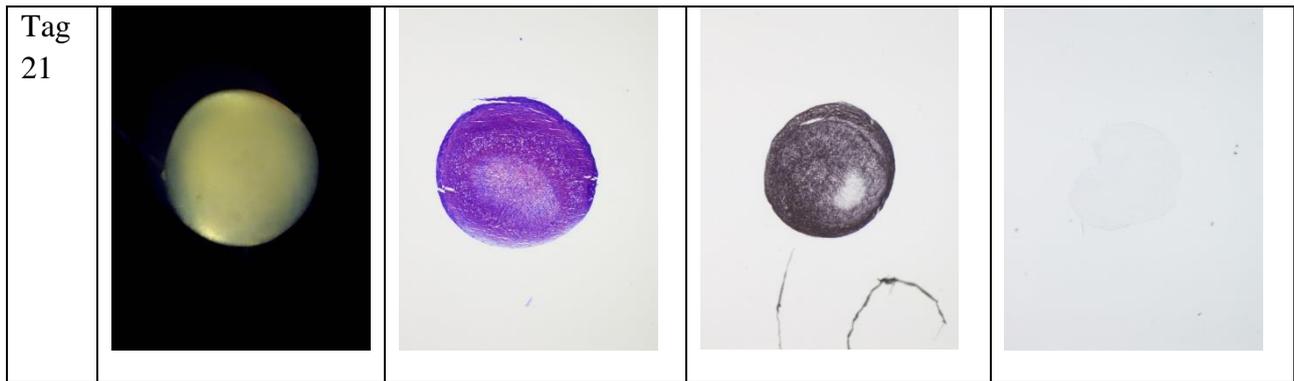


Abb. 3.1.1: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen humaner Zellaggregate der vaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Die Zellaggregate der vaskulären Meniskuszellen zeigen im Verlauf ihrer Differenzierung eine Größenzunahme, die Differenzierung ist an Tag 14 angedeutet, an Tag 21 im gesamten Zellaggregat fortgeschritten. Kollagen I wird ab dem siebten Differenzierungstag gebildet, keine Kollagen II-Bildung während des gesamten Differenzierungszeitraums.

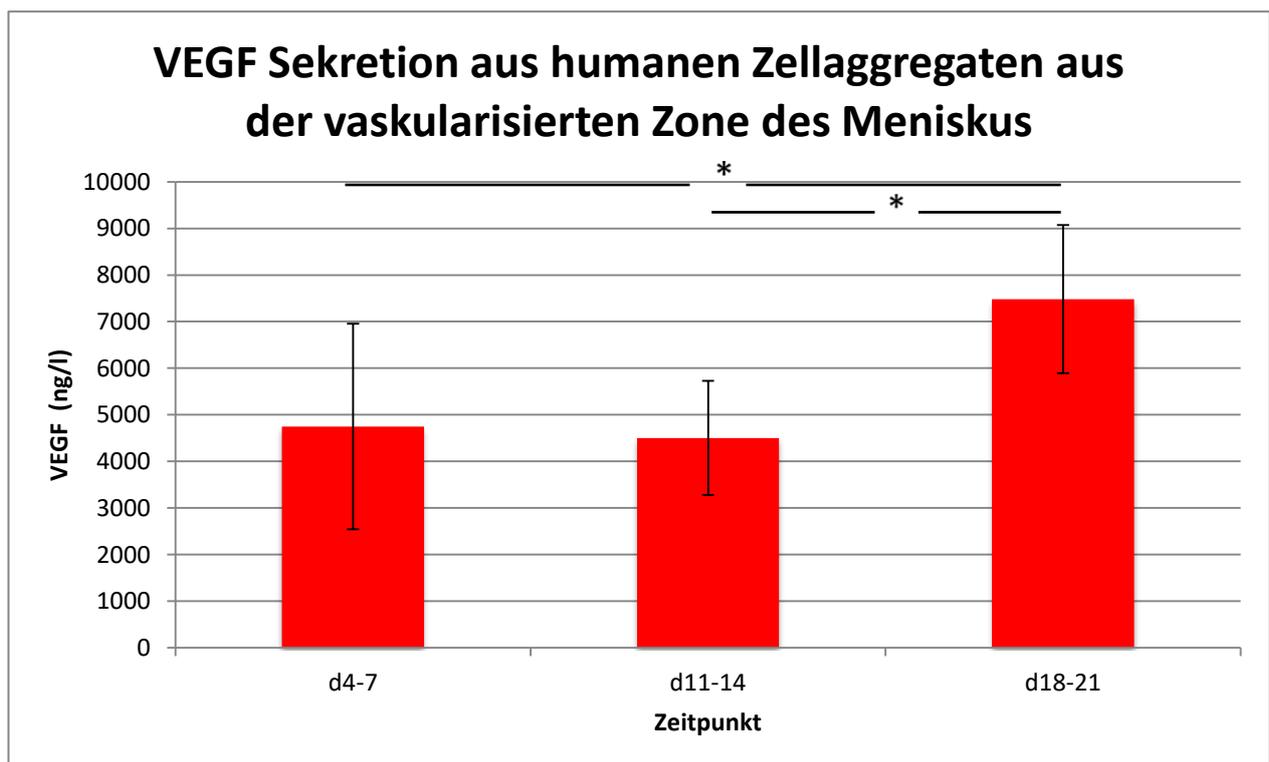


Abb.3.1.2: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion humaner Zellaggregate aus der vaskularisierten Zone des Meniskus zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Bei den Zellaggregaten der humanen, vaskulären Zellen sieht man eine signifikante Steigerung der VEGF-Konzentration zwischen den Tagen 4-7 auf die Tage 18-21 sowie von den Tagen 11-14 auf die Tage 18-21.

Zellaggregate mit Zellen der avaskulären Zone

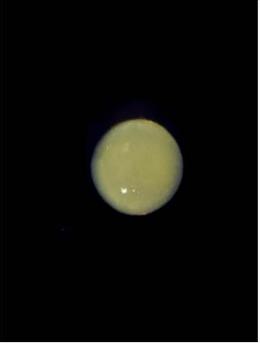
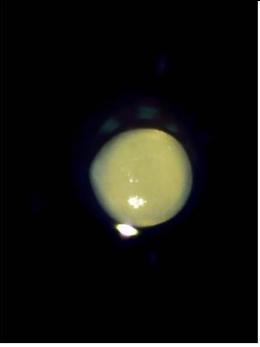
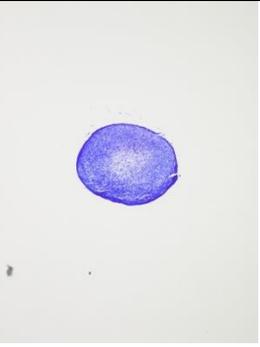
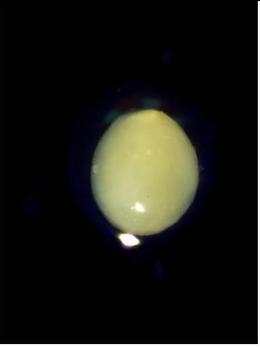
	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				
Tag 21				

Abb. 3.1.3: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen humaner Zellaggregate der avaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Avaskuläre humane Meniskuszellaggregate zeigten eine geringe Größenzunahme im Laufe ihrer Differenzierung. Eine Differenzierung in den DMMB-Färbungen ist ab Tag 21 zu erkennen. Kollagen I wird im gesamten Differenzierungszeitraum stetig fortschreitend gebildet, Kollagen II nicht.

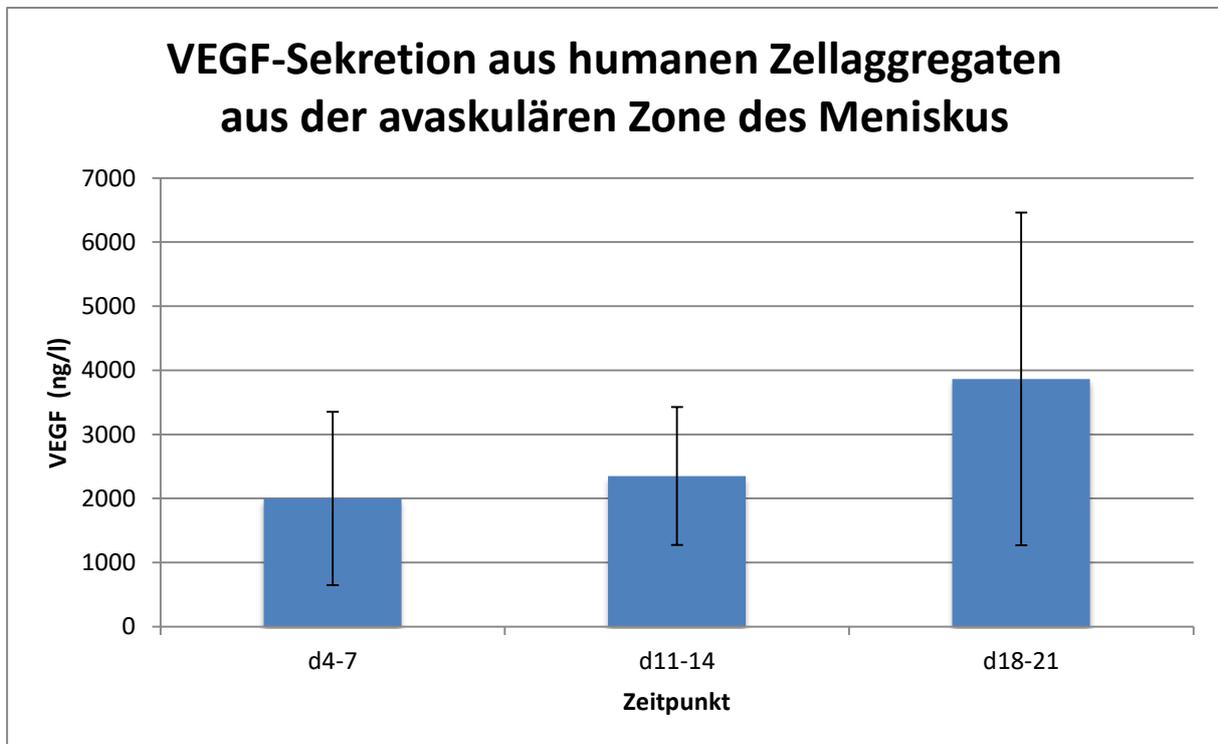


Abb. 3.1.4: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion humaner Zellaggregate aus der avaskulären Zone des Meniskus zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Bei den avaskulären Zellaggregaten zeigte sich eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Steigerung der VEGF-Konzentration im Laufe der Differenzierungsphase.

Zellaggregate mit Zellen der gemischtvaskulären Zone

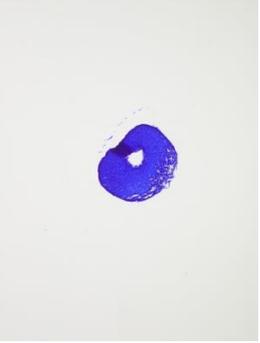
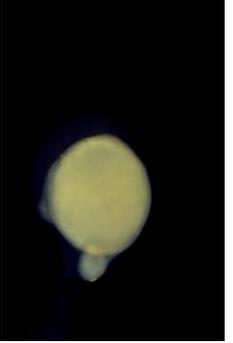
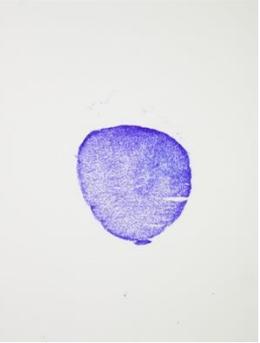
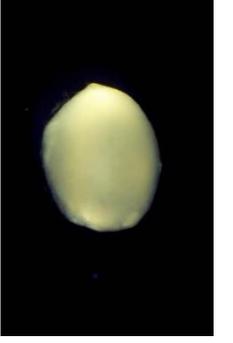
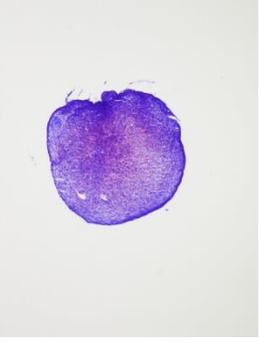
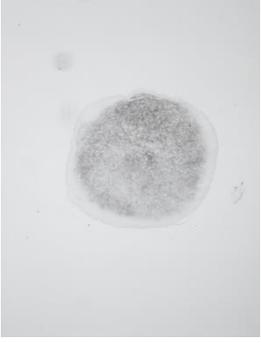
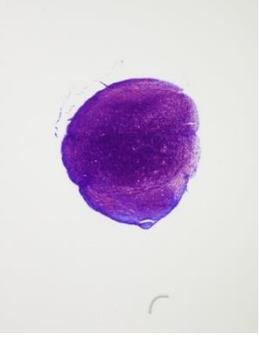
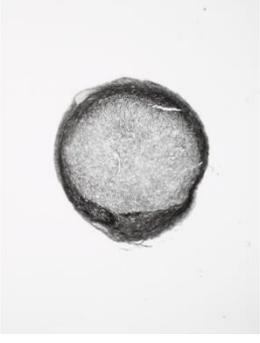
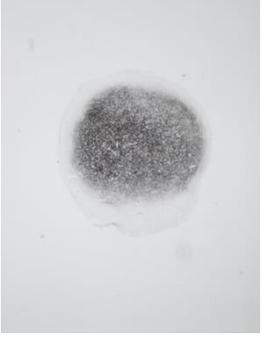
	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				
Tag 21				

Abb.3.1.5: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen humaner Zellaggregate der gemischtvaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Bei den gemischtvaskulären Zellaggregaten waren eine Größenzunahme und eine Differenzierung ab Tag 14 zu erkennen. Kollagen I wird im gesamten Differenzierungszeitraum zunehmend gebildet, Kollagen II ab dem 14ten Differenzierungstag.

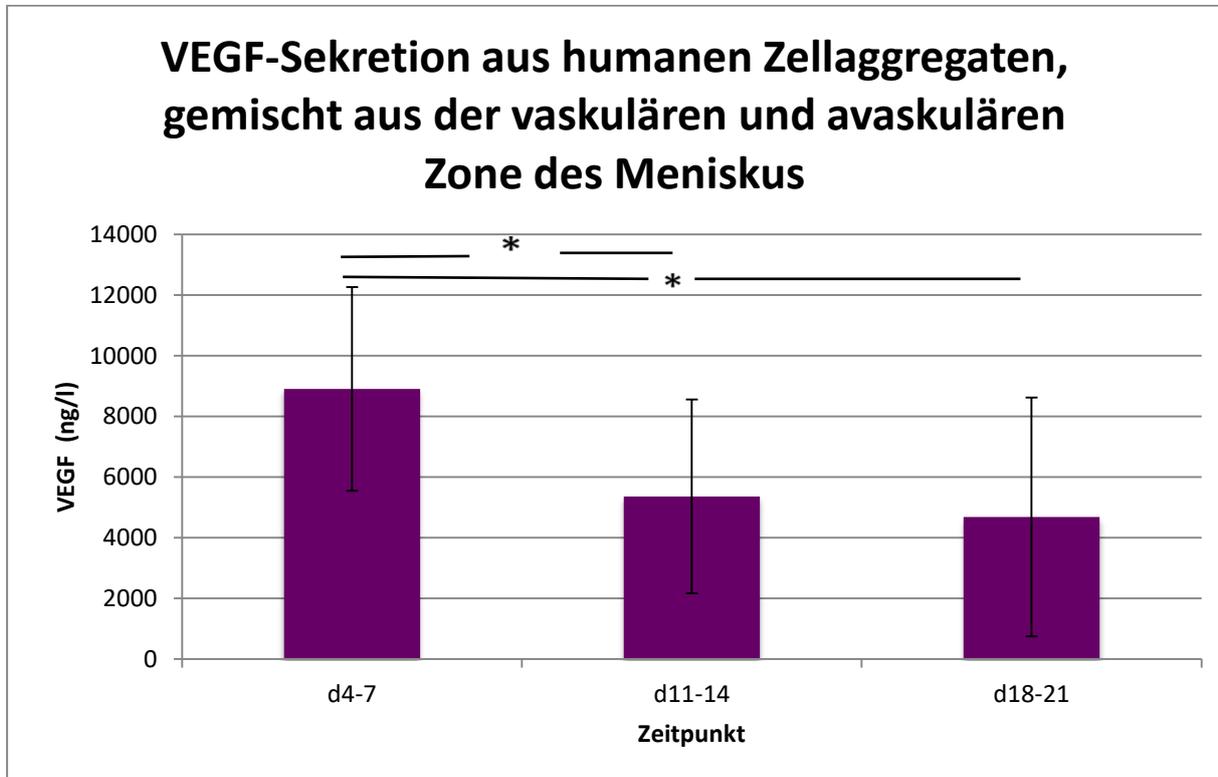


Abb. 3.1.6: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion humaner Zellaggregate, gemischt aus der vaskulären und avaskulären Zone des Meniskus zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Bei den gemischtvaskulären Zellaggregaten kam es zu einer signifikant abnehmenden VEGF-Produktion zwischen den Tagen 4-7 und den Tagen 11-14 und zwischen den Tagen 4-7 und 18-21 bei initial mehr Sekretion im Vergleich zu den Meniskuszellen aus dem vaskulären und avaskulären Bereich.

Zellaggregate aus mesenchymalen Stammzellen

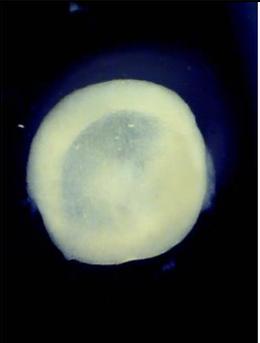
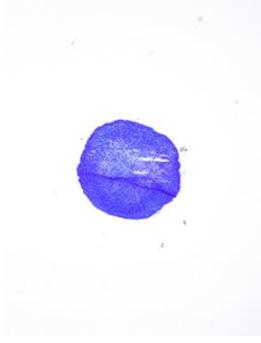
	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				
Tag 21				

Abb. 3.1.7: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen humaner mesenchymaler Zellaggregate in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21

Bei den Zellaggregaten der mesenchymalen Stammzellen war nur eine geringe Größenzunahme der Aggregate im Laufe der Differenzierung festzustellen. Eine Differenzierung in der DMMB-Färbung war ab Tag 21 der Differenzierungsphase zu sehen. Die Kollagen I-Produktion fand ab dem ersten Differenzierungstag zunehmend statt. Eine Kollagen II-Bildung war ab Tag 21 der Differenzierung nachzuweisen.

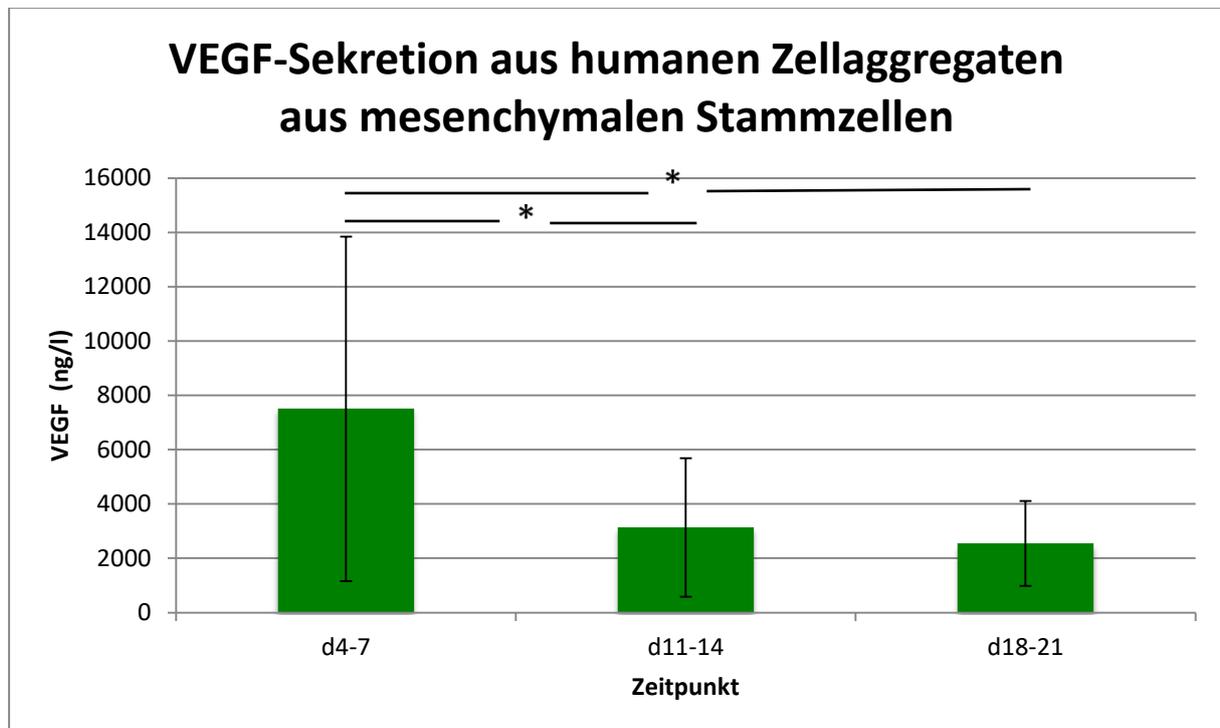


Abb. 3.1.8: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion humaner Zellaggregate aus mesenchymalen Stammzellen Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$

Man beobachtete bei den Zellaggregaten der mesenchymalen Stammzellen eine signifikante Abnahme der VEGF-Produktion zwischen den Tagen 4-7 und 11-14 sowie zwischen den Tagen 4-7 und 18-21. Initial zeigt sich eine ähnlich hohe VEGF-Konzentration wie bei den gemischtvaskulären Meniskuszellaggregaten, tendenziell ein schnellerer Abfall.

3.1.2 Zusammenfassung der humanen Zellaggregate

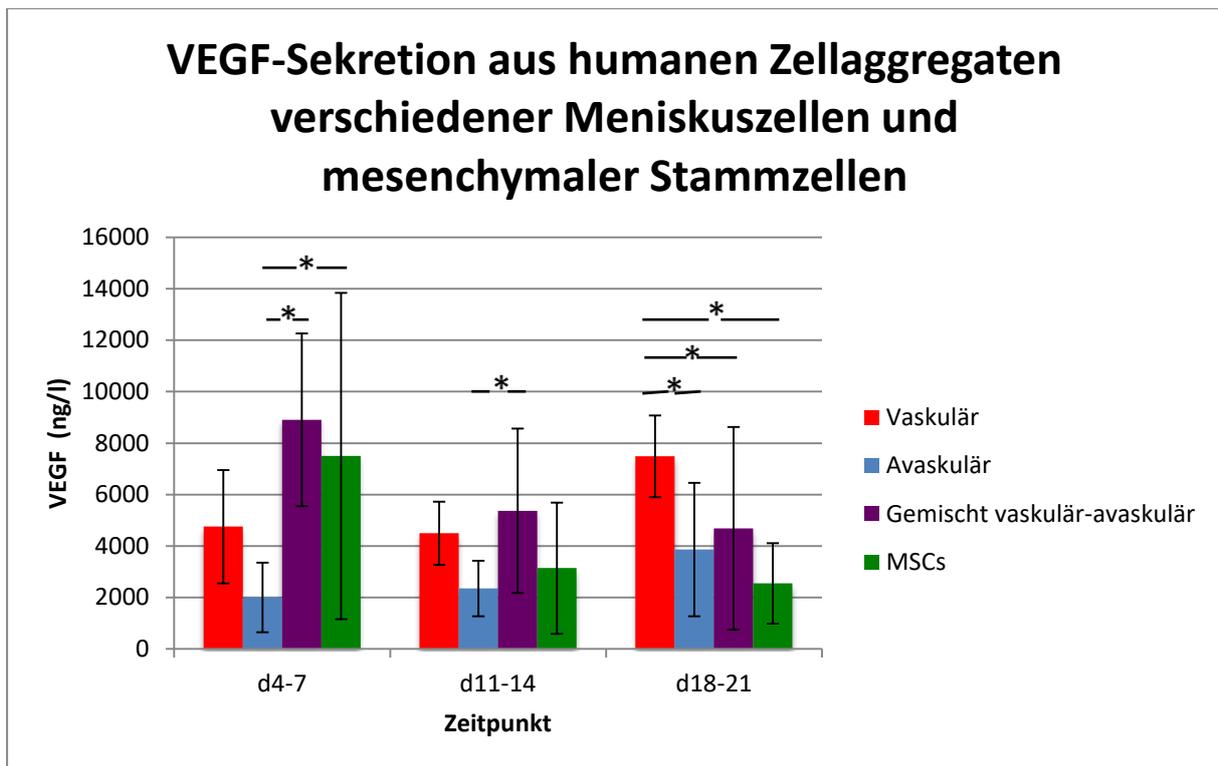


Abb. 3.1.9: Zusammenfassende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus humanen Zellaggregaten verschiedener Meniskuszellen und mesenchymalen Stammzellen zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

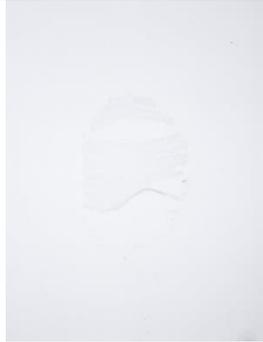
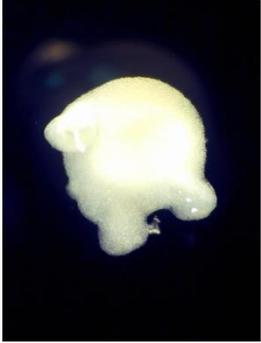
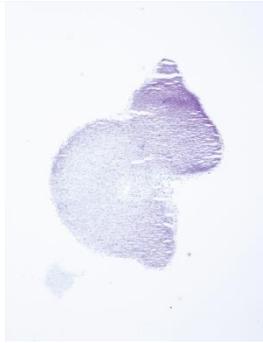
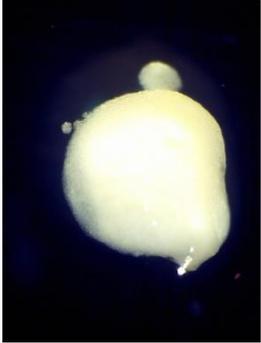
Zusammenfassend ließ sich bei den vaskulären und gemischtvaskulären Meniskuszellaggregaten während der Differenzierungszeit eine deutliche Größenzunahme der Aggregate beobachten, bei avaskulären Meniskuszellaggregaten und mesenchymalen Stammzellaggregaten eine geringe Größenzunahme und Differenzierung. Ein weiterer Unterschied bei der Ausdifferenzierung zeigt die Kollagen II-Bildung. Hier fand bei vaskulären und avaskularisierten Meniskuszellenaggregaten keine Kollagen II-Bildung statt, bei den gemischtvaskularisierten und mesenchymalen Stammzellen jedoch eine Bildung gegen Ende der Differenzierungszeit.

Die vaskulären und avaskulären Meniskuszellaggregate zeigten im Verlauf ihrer Differenzierung einen Anstieg der VEGF-Produktion, die gemischtvaskulären und mesenchymalen Stammzellaggregate einen Abfall. Den höchsten Ausgangswert der VEGF-Produktion hatten die gemischtvaskulären und die MSCs, jeweils signifikant erhöht gegenüber den avaskulären Meniskuszellaggregaten. Die höchste VEGF-Produktion am Ende der Differenzierungszeit hatten die Vaskulären, signifikant erhöht gegenüber den anderen Zellreihen.

3.2 Kaninchenzellaggregate

3.2.1 Färbungen und VEGF-ELISA-Tests

Zellaggregate mit Zellen der vaskulären Zone

	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				

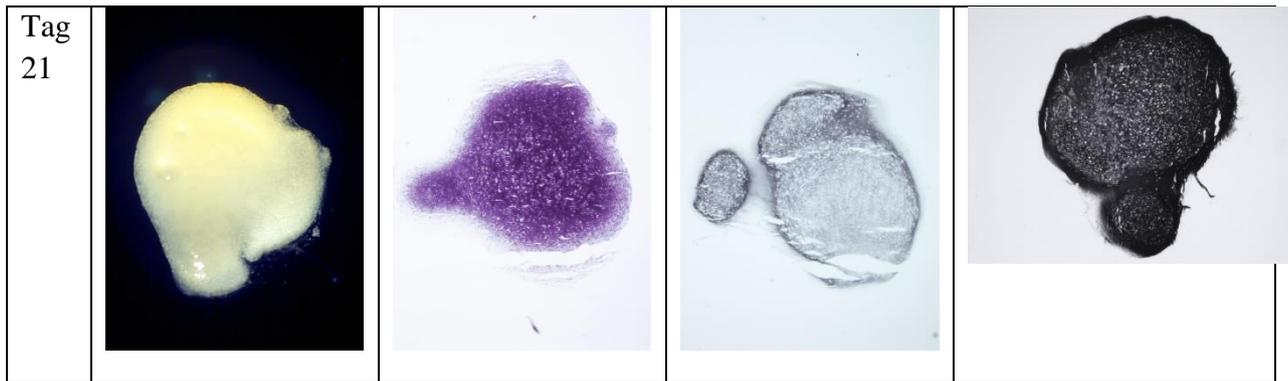


Abb. 3.2.1: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen von Kaninchenzellaggregaten der vaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Bei den vaskularisierten Meniskuszellaggregaten sieht man eine deutliche Größenzunahme während der Differenzierungsphase. Eine chondrogene Differenzierung ist ab Tag 21 erkennbar. Bei der Kollagen-Bildung zeigt sich sowohl für Typ I als auch für II ab Tag 7 eine Differenzierung.

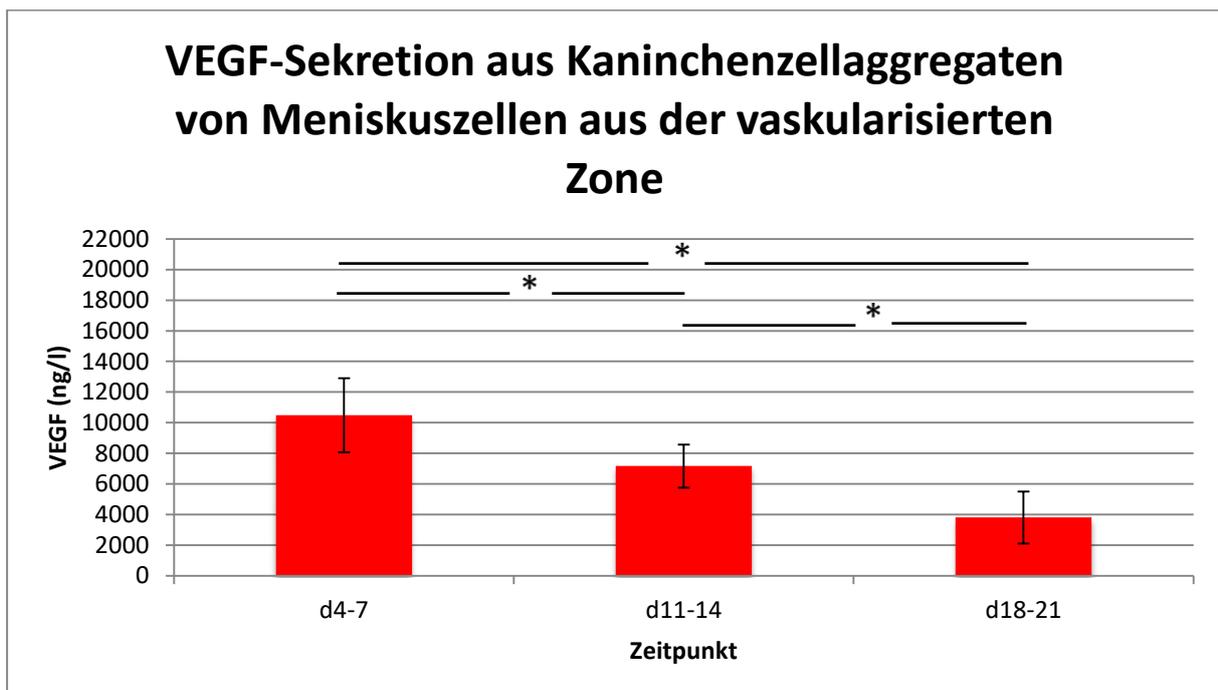


Abb. 3.2.2: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion von Kaninchenzellaggregaten von Meniskuszellen aus der vaskularisierten Zone zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$

Vaskuläre Zellaggregate zeigten einen signifikanten Abfall der VEGF-Sekretion über den Beobachtungszeitraum.

Zellaggregate mit Zellen der avaskulären Zone

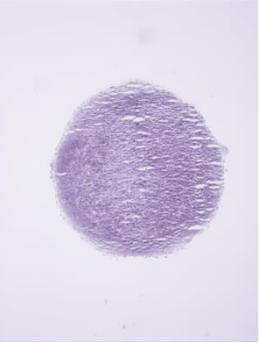
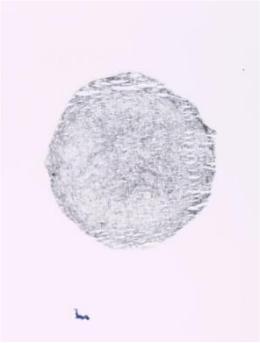
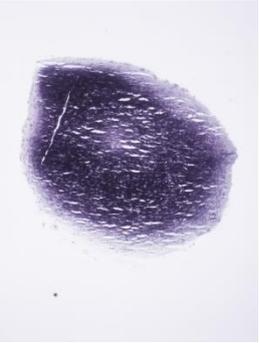
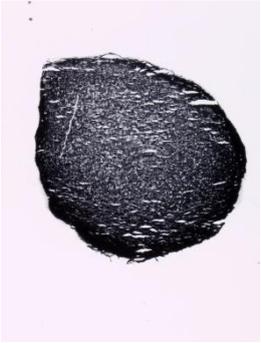
	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				
Tag 21				

Abb. 3.2.3: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen von Kaninchenzellaggregaten der avaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Bei avaskulären Meniskuszellaggregaten zeigt sich eine geringe Größenzunahme. Eine beginnende Differenzierung war ab Tag 7 der Differenzierungszeit zu verzeichnen. Die Kollagen I- und II-Bildung war ab Tag 7 erkennbar.

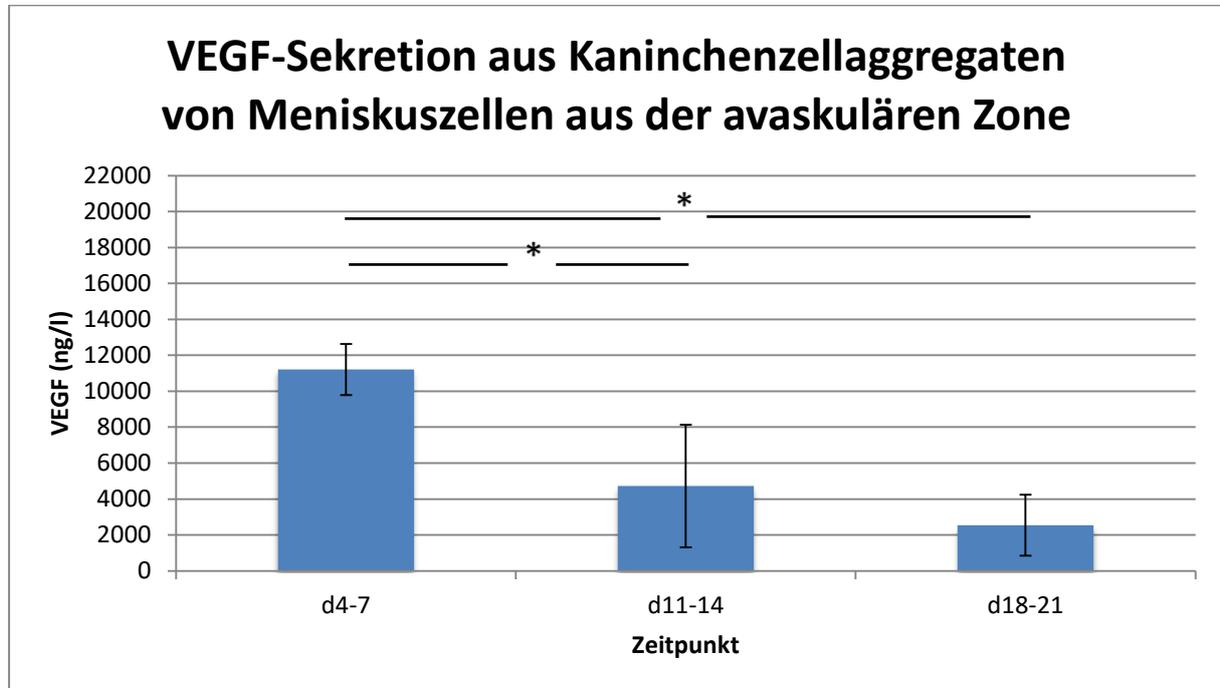


Abb. 3.2.4: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion von Kaninchenzellaggregaten von Meniskuszellen aus der avaskularisierten Zone zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Die VEGF-Produktion sank während der Differenzierungszeit signifikant von Tag 7 auf 14 und von Tag 7 auf Tag 21.

Zellaggregate mit Zellen der gemischtvaskulären Zone

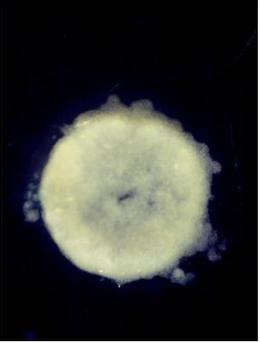
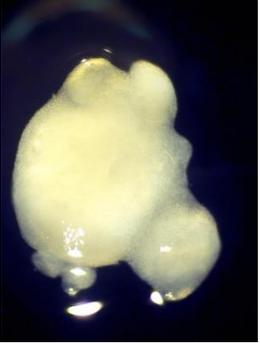
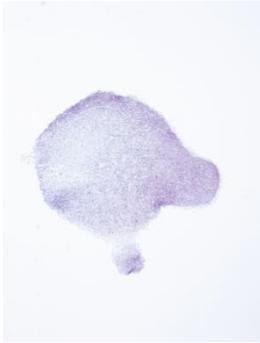
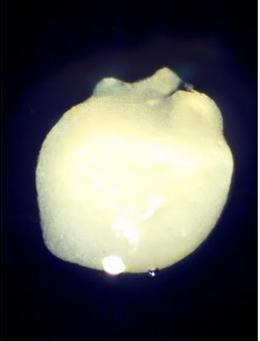
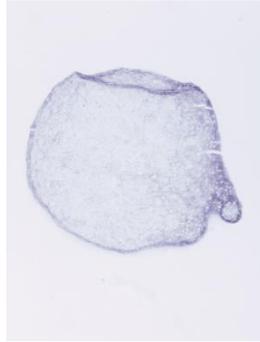
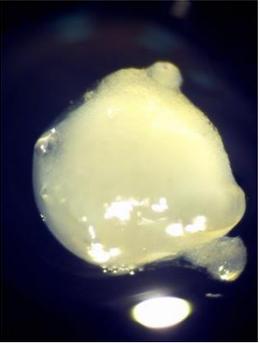
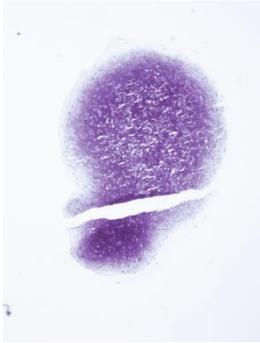
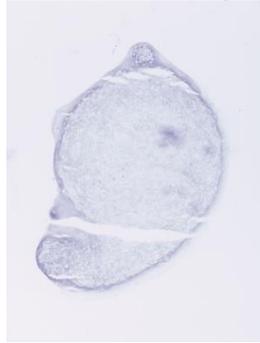
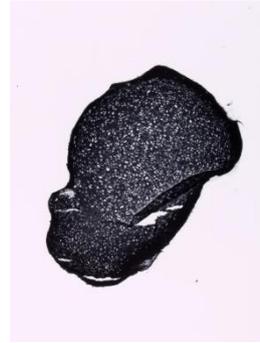
	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				
Tag 21				

Abb. 3.2.5: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen von Kaninchenzellaggregaten der gemischtvaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Bei den gemischtvaskularisierten Meniskuszellaggregaten zeigte sich eine deutliche Größenzunahme der Aggregate. Eine Differenzierung ließ sich ab Tag 7 nachweisen. Beide Kollagentypen waren ab Tag 7 der Differenzierungsphase erkennbar.

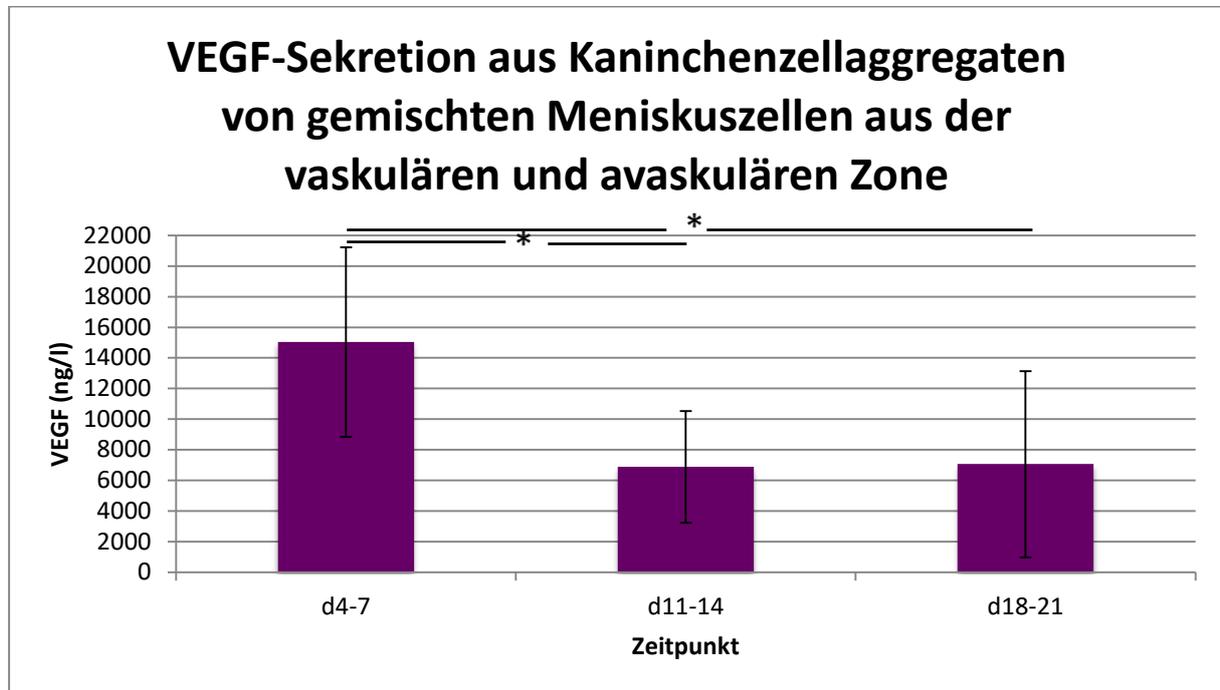


Abb. 3.2.6: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion von Kaninchenzellaggregaten von gemischten Meniskuszellen aus der vaskulären und avaskulären Zone zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Die VEGF-Produktion zeigte einen Abfall in der 3-wöchigen Differenzierung, signifikant von den Tagen 4-7 auf 11-14 und von den Tagen 4-7 auf 18-21.

Zellaggregate aus mesenchymalen Stammzellen

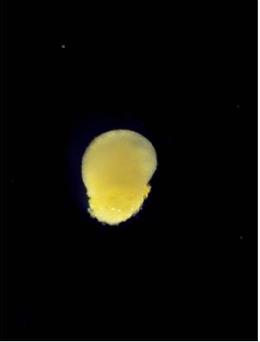
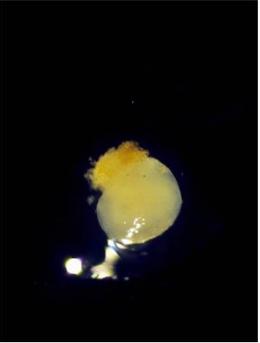
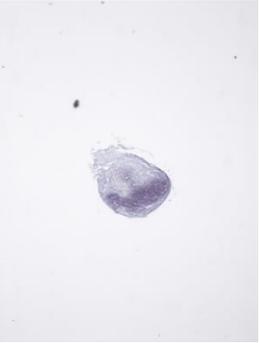
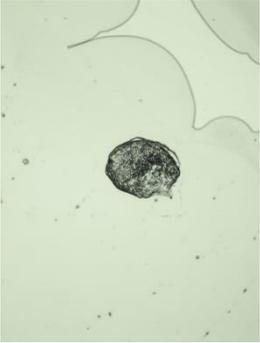
	Makro	DMMB	Kollagen I	Kollagen II
Tag 1				
Tag 7				
Tag 14				
Tag 21				

Abb. 3.2.7: Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen von mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens in jeweiliger Anfärbung zu den Differenzierungszeiten Tag 1,7,14 und 21.

Mesenchymale Stammzellaggregaten weisen nur eine geringe Größenzunahme während der Zeit der Differenzierung auf. Die Kollagen I-Bildung war ab Tag 1 zu erkennen, die Kollagen II-Bildung ab Tag 14.

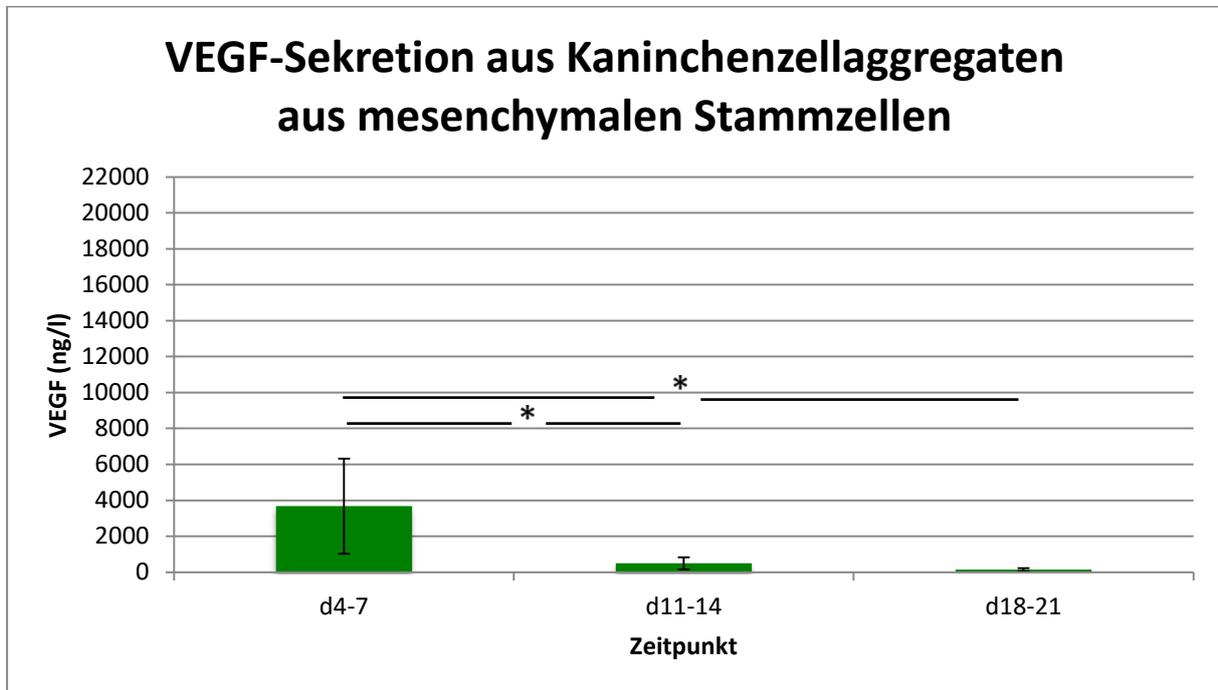


Abb. 3.2.8: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion von Kaninchenzellaggregaten aus mesenchymalen Stammzellen zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Das VEGF wurde stetig geringer sezerniert, signifikant von Tag 7 auf 14 und von Tag 7 auf Tag 21.

3.2.2 Zusammenfassung der Kaninchenzellaggregate

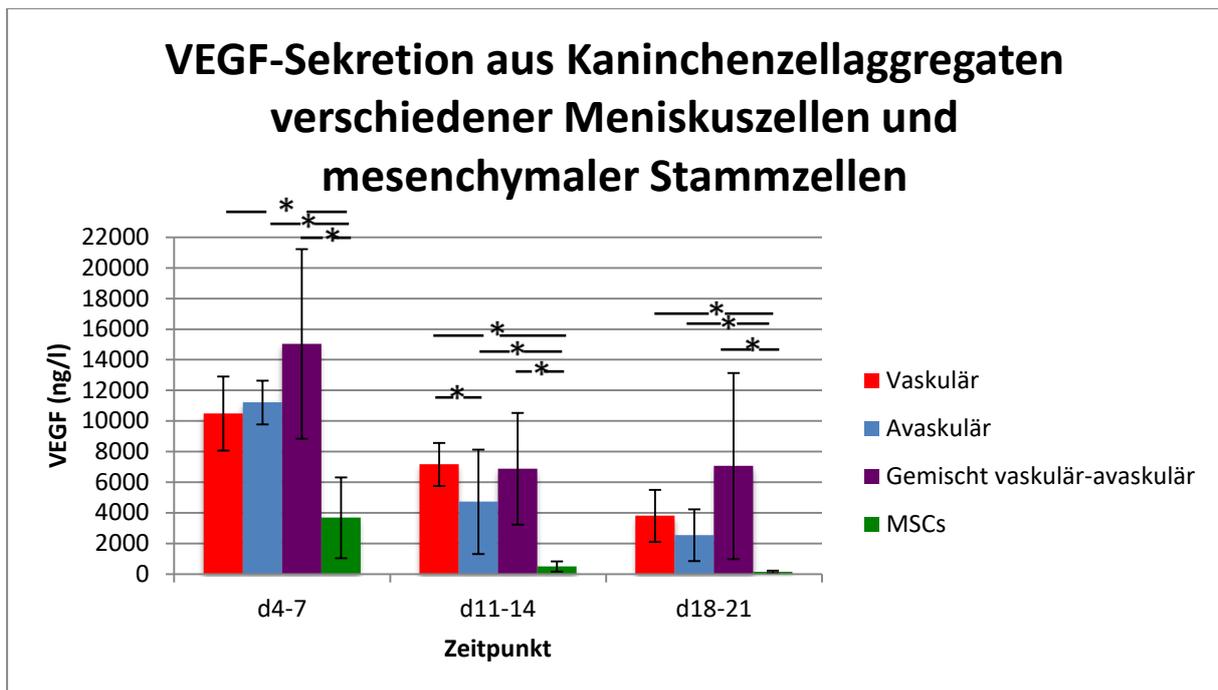


Abb. 3.2.9: Zusammenfassende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus Kaninchenzellaggregaten verschiedener Meniskuszellen und mesenchymaler Stammzellen zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Zusammenfassend ließen sich in Bezug auf die Größenzunahme der Kaninchenzellaggregate im Vergleich zu den humanen Zellaggregaten keine Unterschiede festmachen. Vaskularisierte und gemischtvaskularisierte zeigten jeweils eine deutliche Größenzunahme, während sie bei den avaskulären und mesenchymalen Stammzellaggregaten nur gering war. Bezüglich der Kollagenbildung zeigten Kaninchenzellaggregate eine gesteigerte Synthese, wobei besonders Kollagen II in allen Zelllinien gebildet wurde.

Bei Kaninchenzellaggregaten fiel die VEGF-Produktion sowohl bei Meniskuszellen als auch bei den mesenchymalen Stammzellen im Laufe des Differenzierungszeitraums ab. Zu jedem Messzeitpunkt war die Menge an sezerniertem VEGF der verschiedenen Meniskuszellen signifikant gegenüber der MSCs erhöht. Bezüglich des Abfalls der VEGF-Konzentration über die Zeit sind die gemischten Meniskuszellaggregate und die Stammzellaggregate von Mensch und Kaninchen vergleichbar.

Bei der Vergleichbarkeit zu den Zellen humanen Ursprungs kann das Kaninchen als Zellquelle für die Analyse der verschiedenen Zelllinien bezüglich der VEGF Produktion und Sekretion über die Zeit verwendet werden, vor allem für die gemischt vaskulär-avaskulären Meniskuszellen und für die MSCs.

3.3 Zell-Matrix-Konstrukte von Kaninchenzellreihen

3.3.1 Färbungen und VEGF-ELISA-Tests

Matrix mit vaskulären Meniskuszellen ohne Vorkultur (Tag21)

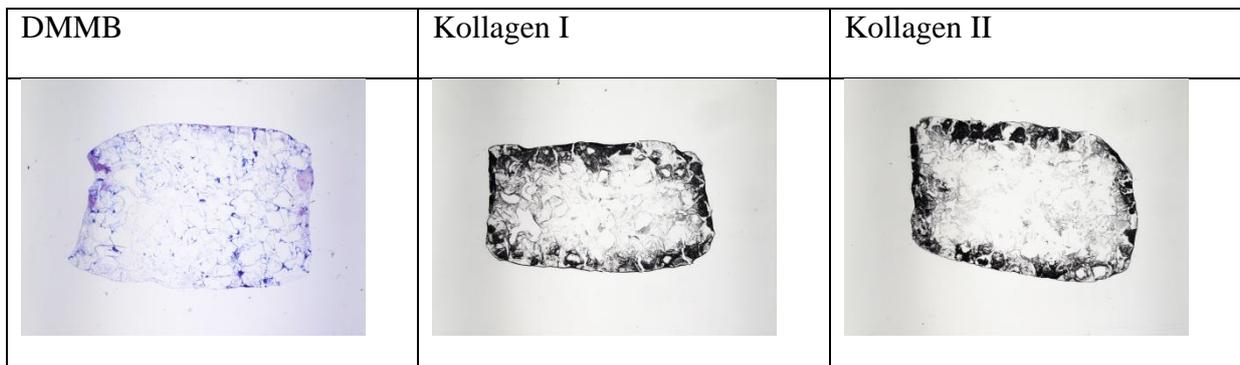


Abb. 3.3.1: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit Meniskuszellen aus der vaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung ohne Vorkultur.

Matrix mit vaskulären Meniskuszellen mit Vorkultur (Tag35)

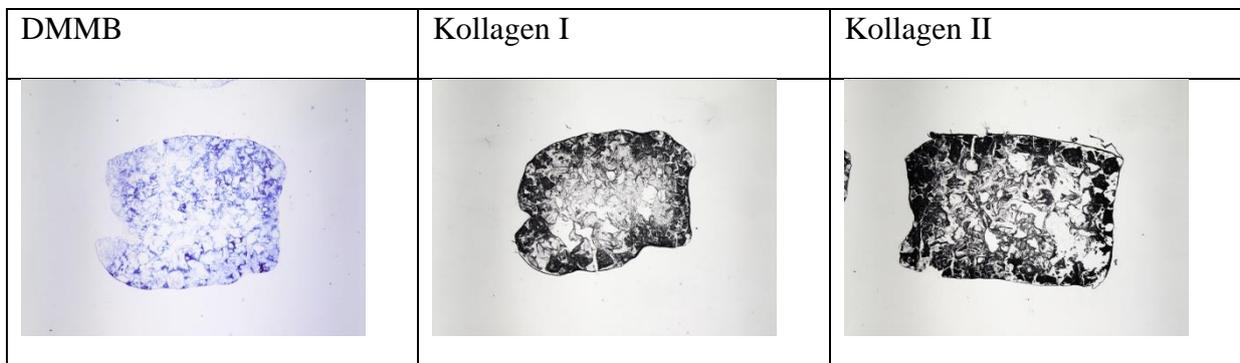


Abb. 3.3.2: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit Meniskuszellen aus der vaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung mit Vorkultur.

Bei den vaskulären Meniskuszell-Matrix-Konstrukten war sowohl ohne als auch mit Vorkultur eine Differenzierung der Matrices erkennbar. Ohne Vorkultur war besonders bei den Kollagenbildungen nur im Randbereich der Matrices eine Bildung, mit Vorkultur in der gesamten Matrix zu sehen.

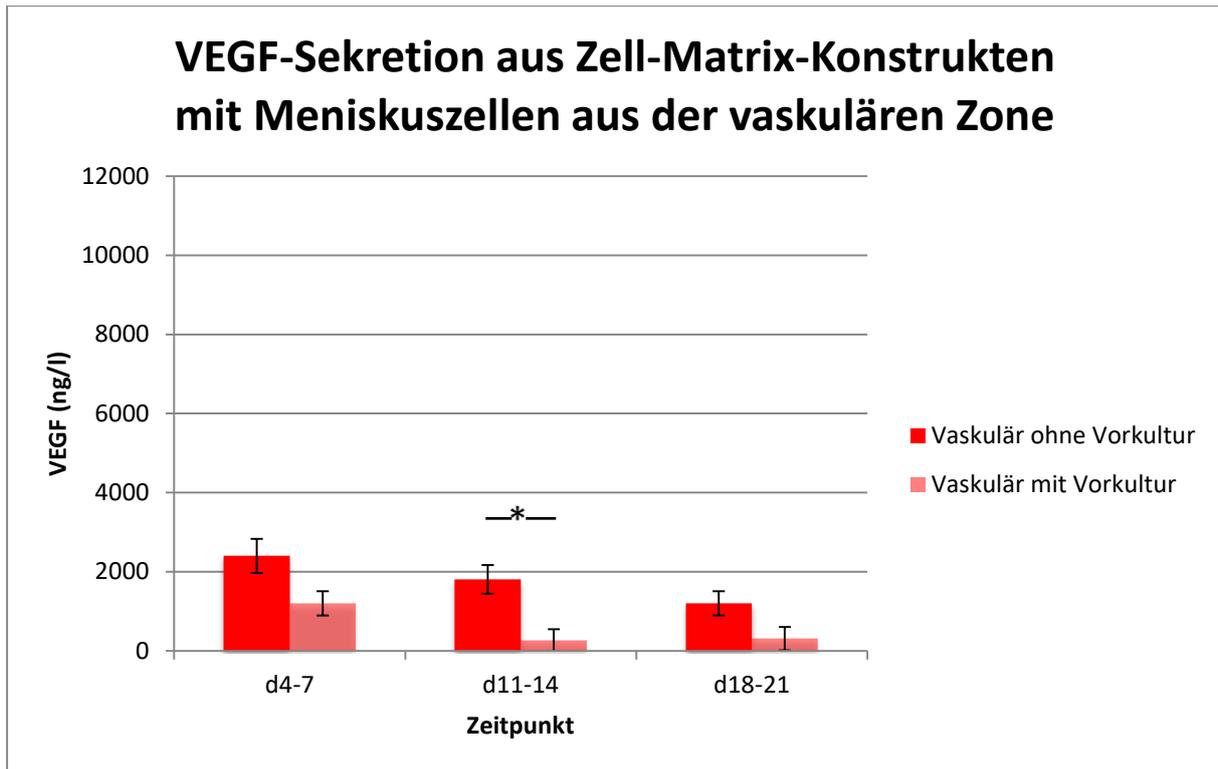


Abb. 3.3.3: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus Zell-Matrix-Konstrukten mit Meniskuszellen aus der vaskulären Zone ohne und mit Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Tendenziell zeigte sich in beiden Gruppen eine abfallende VEGF-Sekretion im Laufe der Differenzierungszeit. Zell-Matrix-Konstrukte ohne Vorkultur zeigten tendenziell zu jedem Zeitpunkt höhere Werte, signifikant an Tag 14.

Matrix mit avaskulären Meniskuszellen ohne Vorkultur (Tag 21)

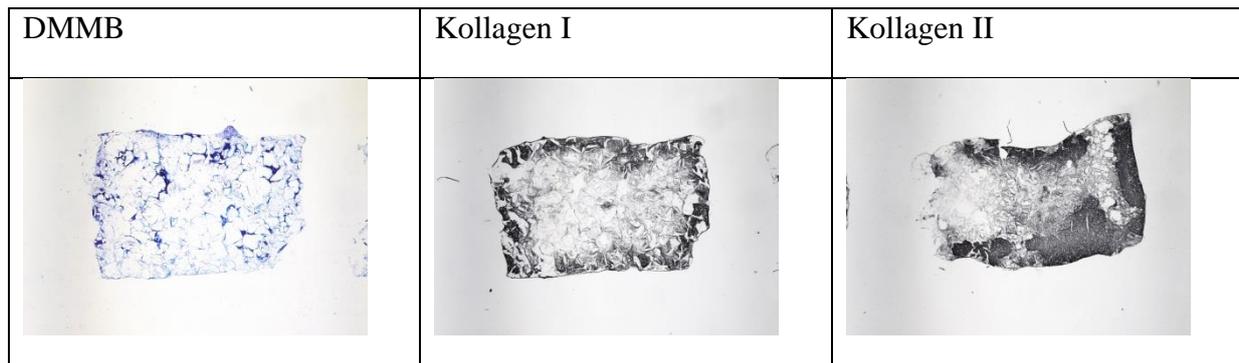


Abb. 3.3.4: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit Meniskuszellen aus der avaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung ohne Vorkultur.

Matrix mit avaskulären Meniskuszellen mit Vorkultur (Tag35)

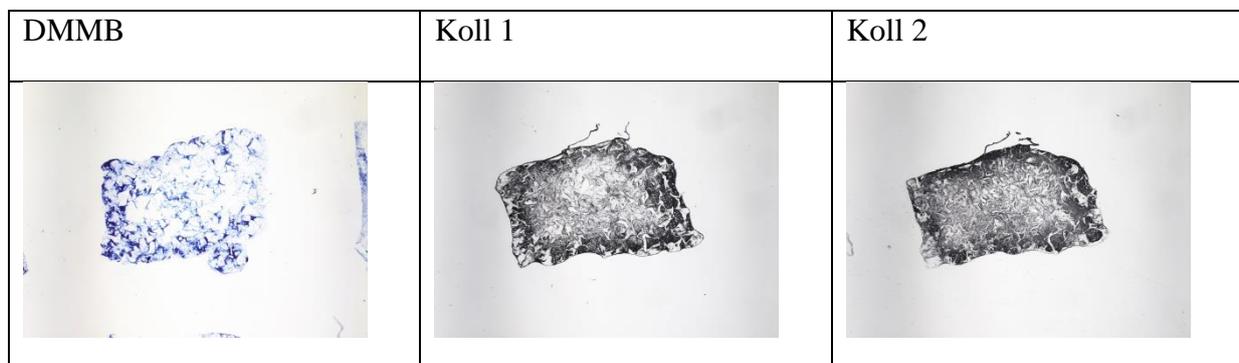


Abb. 3.3.5: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit Meniskuszellen aus der avaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung mit Vorkultur.

Bei den avaskulären Meniskuszell-Matrix-Konstrukten zeigte sich eine bessere Differenzierung der Kollagenbildung, wenn die Matrices eine zweiwöchige Vorkultur vor der eigentlichen dreiwöchigen Differenzierung erhielten.

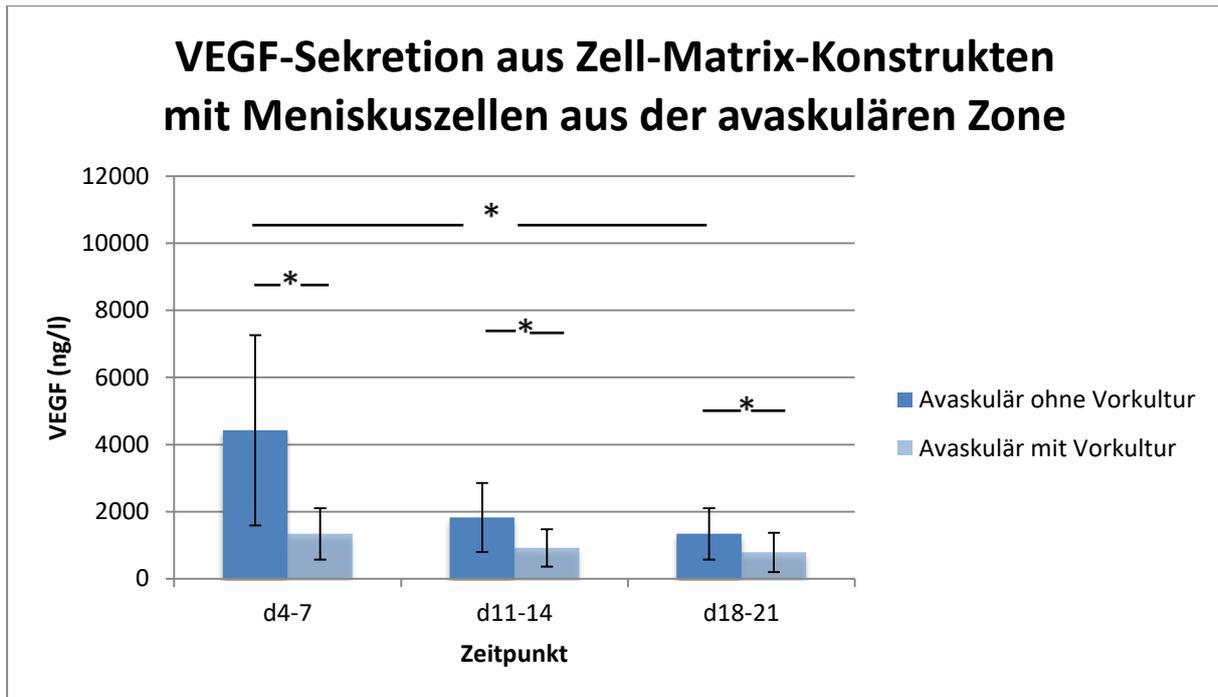


Abb. 3.3.6: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus Zell-Matrix-Konstrukten mit Meniskuszellen aus der avaskulären Zone ohne und mit Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Die VEGF-Sekretion vermindert sich sowohl ohne als auch mit Vorkultur im Laufe der Differenzierung. Eine signifikant höhere VEGF-Sekretion der Zell-Matrixkonstrukte ohne Vorkultur als mit Vorkultur war zu allen Messpunkten nachweisbar.

Zudem war eine signifikante Reduktion der VEGF-Sekretion der avaskulären Meniskuszell-Matrixkonstrukte ohne Vorkultur von Tag 7 auf Tag 21 erkennbar.

Matrix mit gemischtvasculären Meniskuszellen ohne Vorkultur (Tag 21)

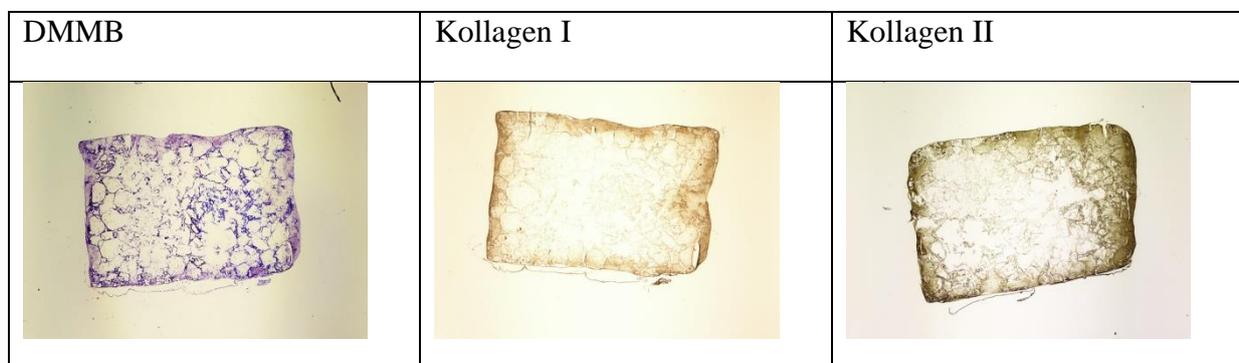


Abb. 3.3.7: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit gemischten Meniskuszellen aus der vaskulären und avaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung ohne Vorkultur.

Matrix mit gemischtvaskulären Meniskuszellen mit Vorkultur (Tag 35)

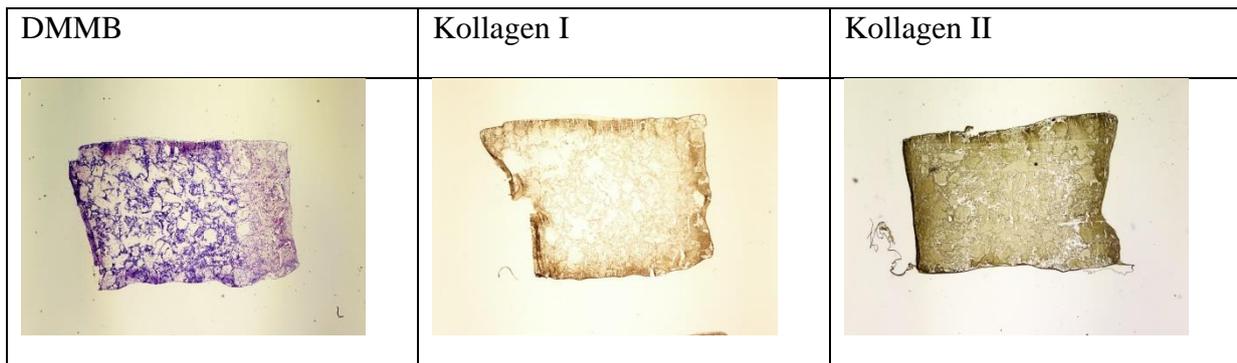


Abb. 3.3.8: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit gemischten Meniskuszellen aus der vaskulären und avaskulären Zone in jeweiliger Anfärbung mit Vorkultur.

Bei den gemischtvaskulären Zellen erkannte man ohne Vorkultur nur im Randbereich eine Kollagenbildung, mit Vorkultur ist diese im gesamten Matrixbereich vorhanden.

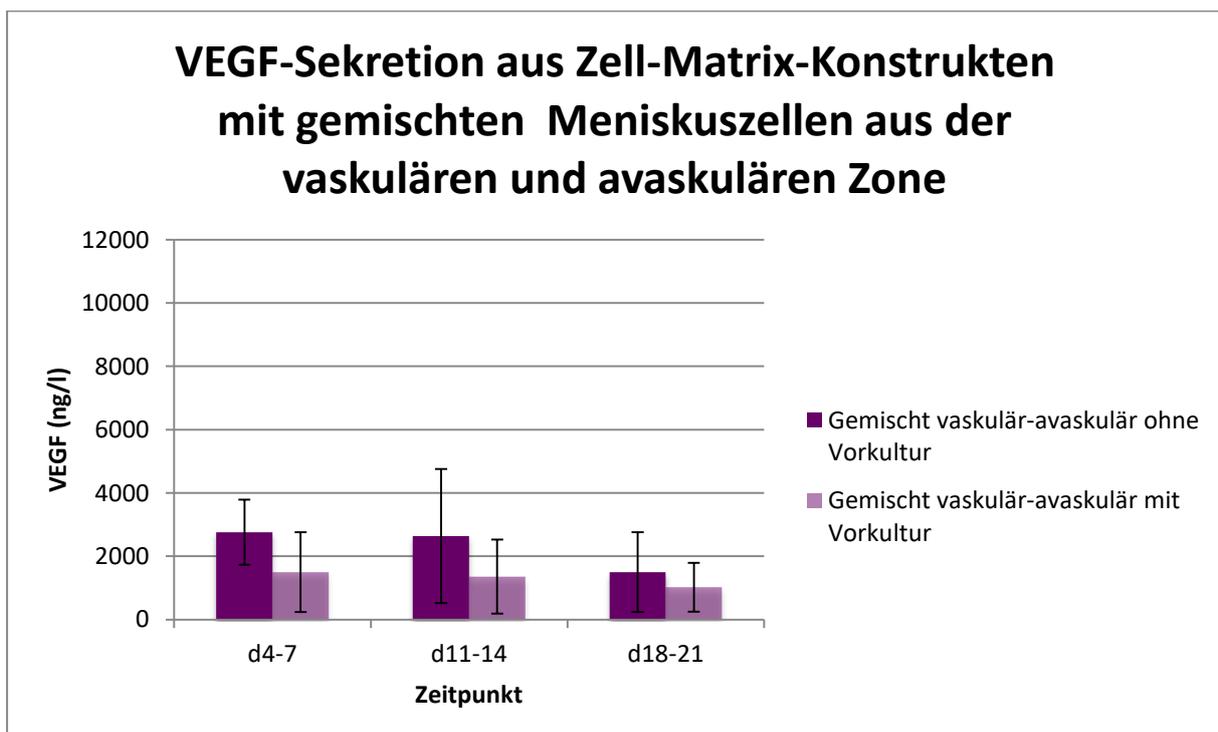


Abb. 3.3.9: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus Zell-Matrix-Konstrukten mit gemischten Meniskuszellen aus der vaskulären und avaskulären Zone ohne und mit Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

VEGF wurde im Verlauf abfallend gebildet, ohne Vorkultur wurde mehr produziert als mit Vorkultur, ohne dass ein Signifikanzniveau erreicht wurde.

Matrix mit mesenchymalen Stammzellen ohne Vorkultur (Tag 21)

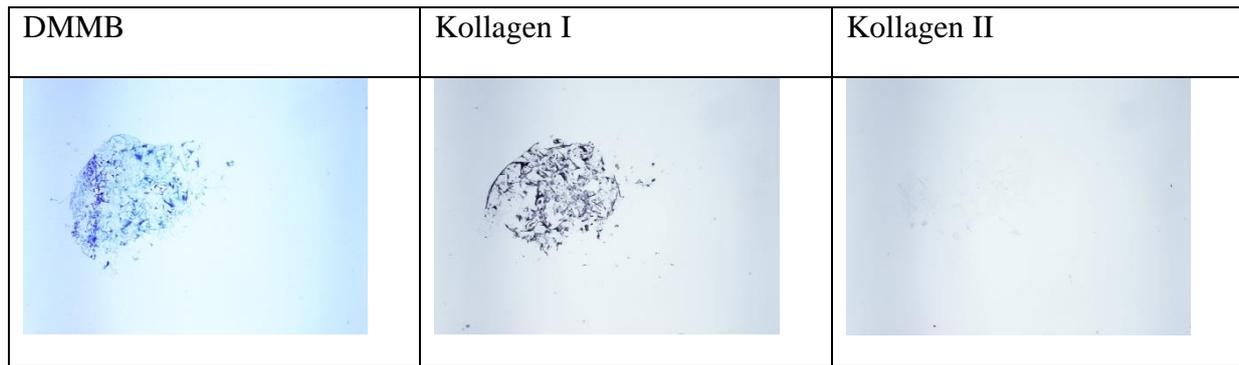


Abb. 3.3.10: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit mesenchymalen Stammzellen in jeweiliger Anfärbung ohne Vorkultur.

Matrix mit mesenchymalen Stammzellen mit Vorkultur (Tag 35)

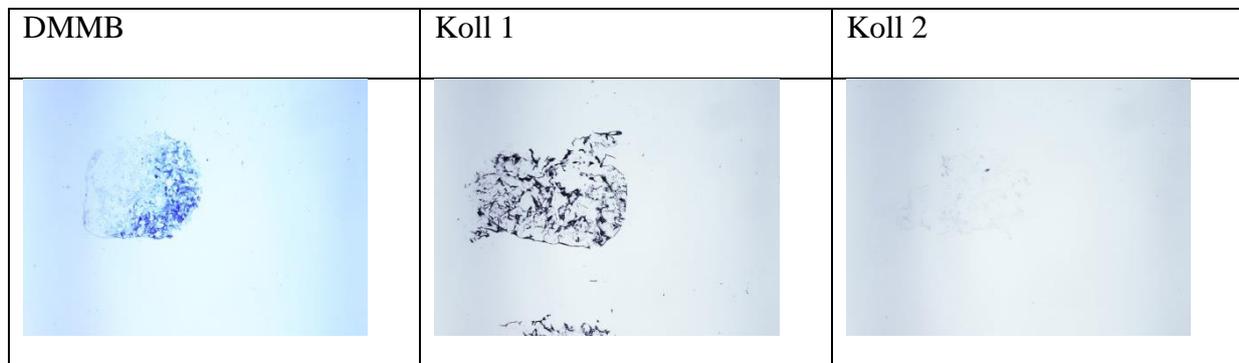


Abb. 3.3.11: Mikroskopische Aufnahmen von Zell-Matrix-Konstrukten, besetzt mit mesenchymalen Stammzellen in jeweiliger Anfärbung mit Vorkultur.

Die mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Matrices wiesen keine einheitliche Differenzierung auf. Die Kollagen I-Produktion war auch nach 2-wöchiger Vorkultur nur rudimentär entwickelt. Eine Kollagen II-Bildung konnte selbst nach 2-wöchiger Vordifferenzierung nicht nachgewiesen werden.

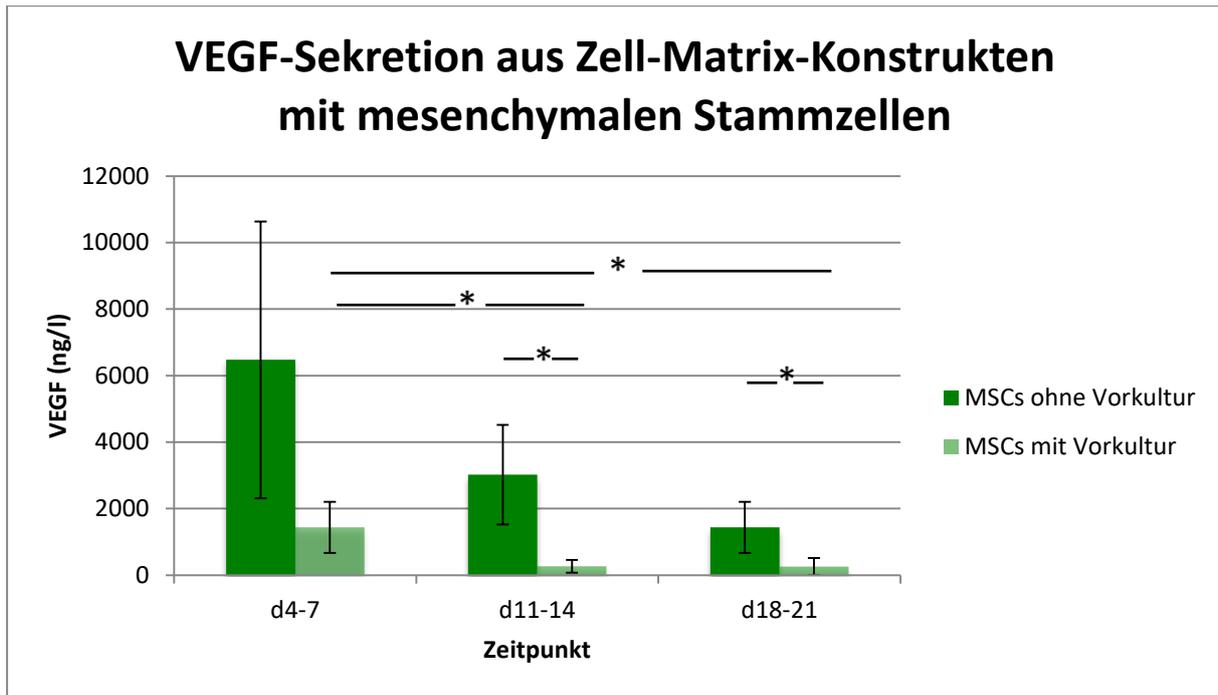


Abb. 3.3.11: Statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus Zell-Matrix-Konstrukten mit mesenchymalen Stammzellen ohne und mit Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Die Produktion an VEGF sank im Laufe der Differenzierungszeit, signifikant mit Vorkultur zwischen Tag 7 und 14 als auch zwischen Tag 7 und Tag 21. Ohne Vorkultur wurde mehr VEGF sezerniert als mit Vorkultur, signifikant in den Zeitintervallen Tag 11-14 und Tag 18-21.

3.3.2 Zusammenfassung der Zell-Matrix-Konstrukte von Kaninchenzellreihen

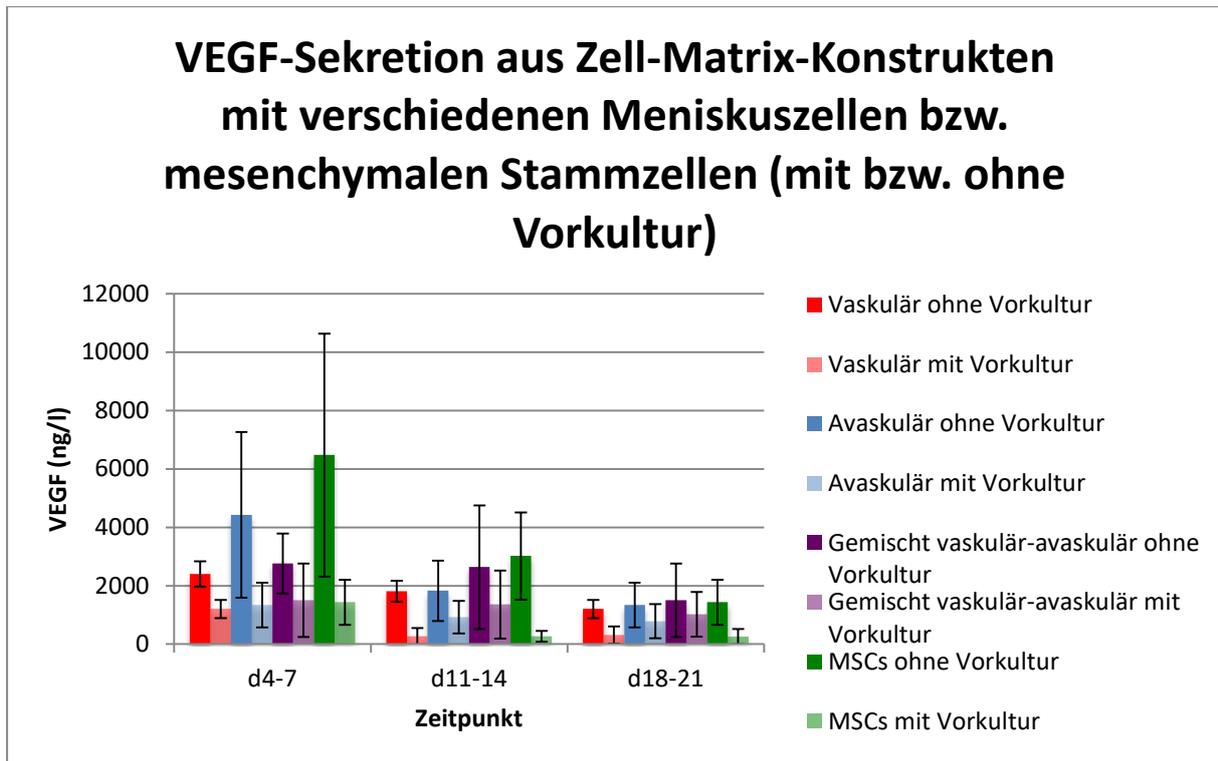


Abb. 3.3.12: Zusammenfassende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus Zell-Matrix-Konstrukten mit verschiedenen Meniskuszellen bzw. mesenchymalen Stammzellen ohne und mit Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 4-7, Tag 11-14 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Zusammenfassend wirkte sich eine Vorkultur der Zell-Matrix-Konstrukte positiv auf die jeweilige Kollagenbildung aus. Während bei den Meniskuszellaggregaten eine Kollagenbildung beider untersuchten Typen in der gesamten Matrix nachweisbar war, bildeten mesenchymale Stammzellkonstrukte kein Kollagen II; Kollagen I nur rudimentär aus. Mesenchymale Stammzellaggreare alleine bildeten Kollagen II, im Zusammenspiel mit Matrices allerdings nicht.

Zell-Matrix-Konstrukte sowohl mit als auch ohne Vorkultur zeigten einen Abfall ihrer VEGF-Produktion. Ohne Vorkultur war die VEGF-Produktion höher als mit Vorkultur.

Ohne Vorkultur zeigten mesenchymale Stammzell-Matrix-Konstrukte im Vergleich zu Meniskuszell-Matrix-Konstrukten tendenziell eine gesteigerte VEGF-Produktion.

Trotz der geringeren Zellzahl in einem Aggregat im Vergleich zu Zell-Matrixkonstrukten zeigen Zellaggregate eine höhere VEGF-Sekretion in das Kulturmedium, vor allem initial als

Zell-Matrix-Konstrukte entsprechender Zellquelle. Somit ist ein hemmender Einfluss der Gelatine-Hyaluronsäure Matrix auf die VEGF-Sekretion anzunehmen.

3.4 Meniskusringe

3.4.1 Meniskusring mit Leerdefekt und Meniskusring mit Leermatrix im Leerdefekt

Makroskopische Aufnahmen eines Meniskusringes mit **Leerdefekt** und einer **Leermatrix im Leerdefekt** nach dreiwöchiger Differenzierung:

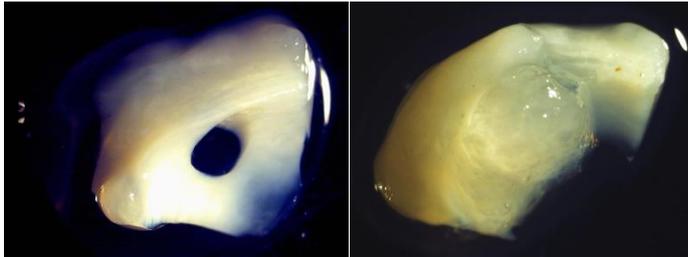


Abb. 3.4.1.1: Makroskopische Aufnahmen. Links: Meniskusring mit Leerdefekt nach dreiwöchiger Differenzierung. Rechts: Leermatrix im Leerdefekt des Meniskus nach dreiwöchiger Differenzierung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes mit **Leerdefekt** nach dreiwöchiger Differenzierung:

DMMB	Kollagen I	Kollagen II

Abb. 3.4.1.2: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes mit Leerdefekt nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Der Leerdefekt im Meniskusring blieb während der Differenzierungszeit leer ohne Hinweis für das Einwachsen von Zellen in den Defekt.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes mit einer **Leermatrix im Leerdefekt** nach dreiwöchiger Differenzierung:

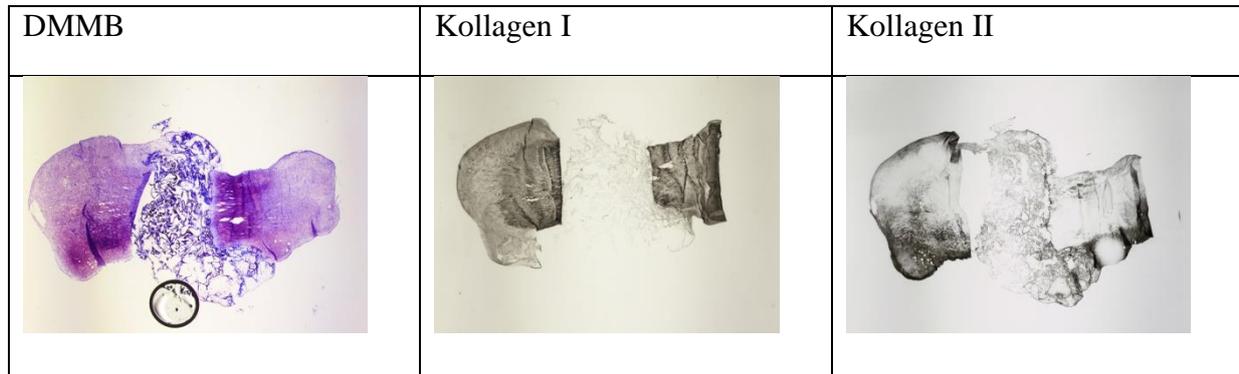


Abb. 3.4.1.3: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes mit Leermatrix im Leerdefekt nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Die Leermatrices zeigten eine partielle Integration in den Meniskus. Die Kollagen II -Bildung in der Leermatrix war gegenüber der Kollagen I-Bildung deutlich gesteigert.

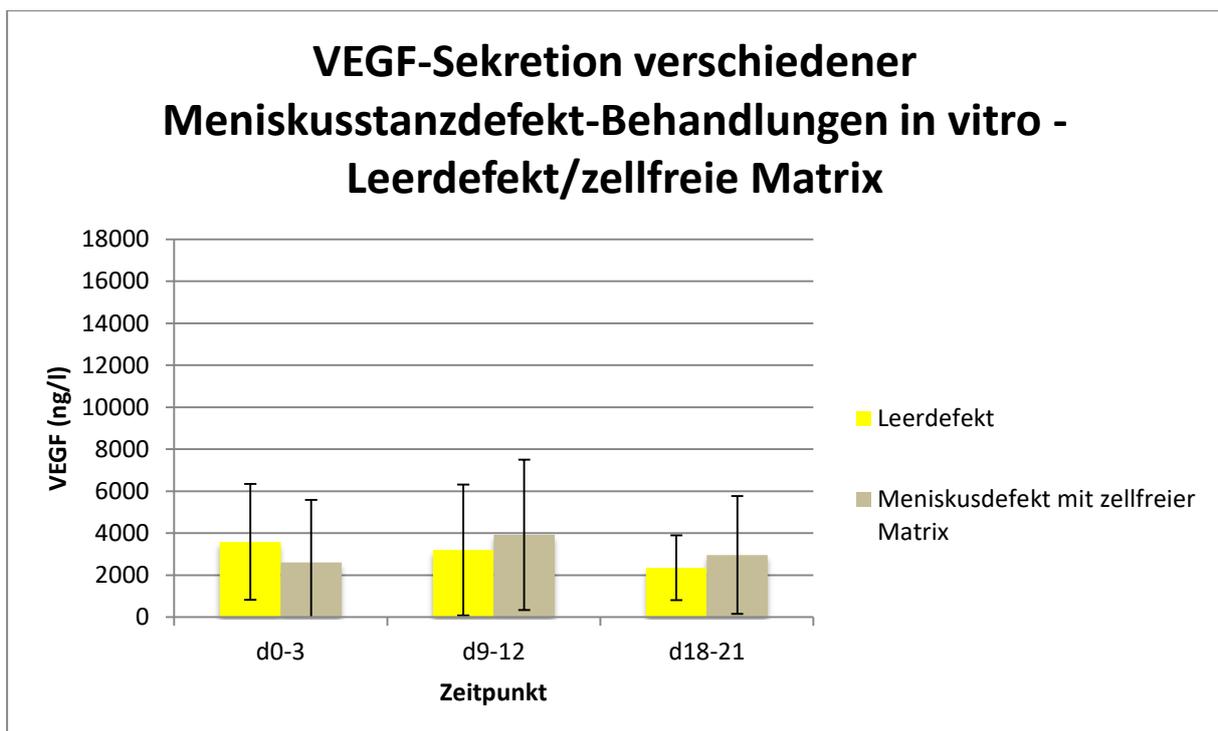


Abb. 3.4.1.4: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus einem Meniskusring mit Leerdefekt und einem Meniskusring, gefüllt mit zellfreier Matrix zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Meniskusgewebe zeigte per se eine VEGF-Sekretion über die Zeit. Diese erwies sich als konstant während der gesamten Kulturphase. Die Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix hatte keinen Einfluss auf die VEGF-Sekretion aus dem Meniskusring.

3.4.2 Zell-Matrixbehandlung eines Meniskusdefektes in vitro

3.4.2.1 Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich

Makroskopische Bilder eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich ohne Vorkultur, mit zweiwöchiger und mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

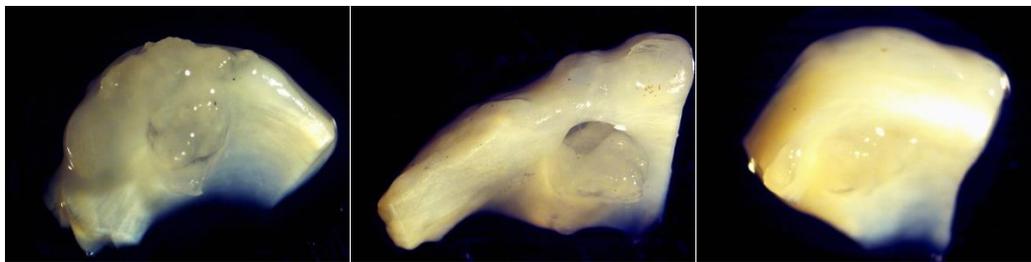


Abb. 3.4.2.1.1: Makroskopische Aufnahmen von Meniskusringen mit Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich des Meniskus. Links: Ohne Vorkultur. Mitte: Mit zweiwöchiger Vorkultur. Rechts: Mit fünfwöchiger Vorkultur.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich ohne Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

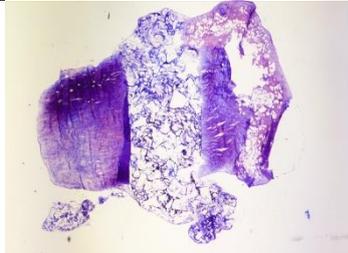
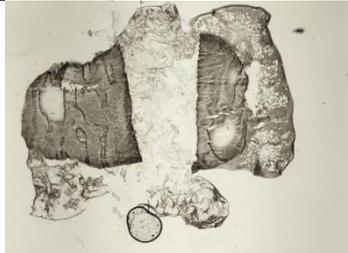
DMMB	Kollagen I	Kollagen II
		

Abb. 3.4.2.1.2: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich ohne Vorkultur nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich mit zweiwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

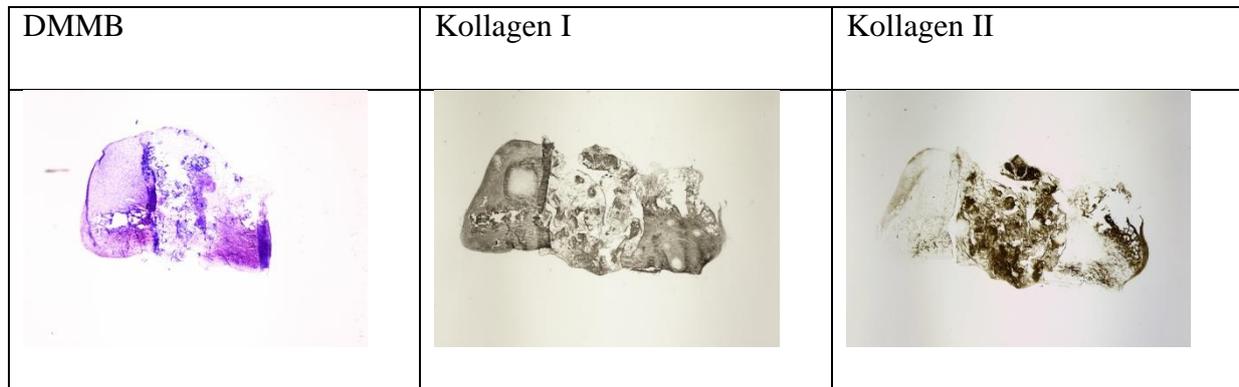


Abb. 3.4.2.1.3: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich mit zweiwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

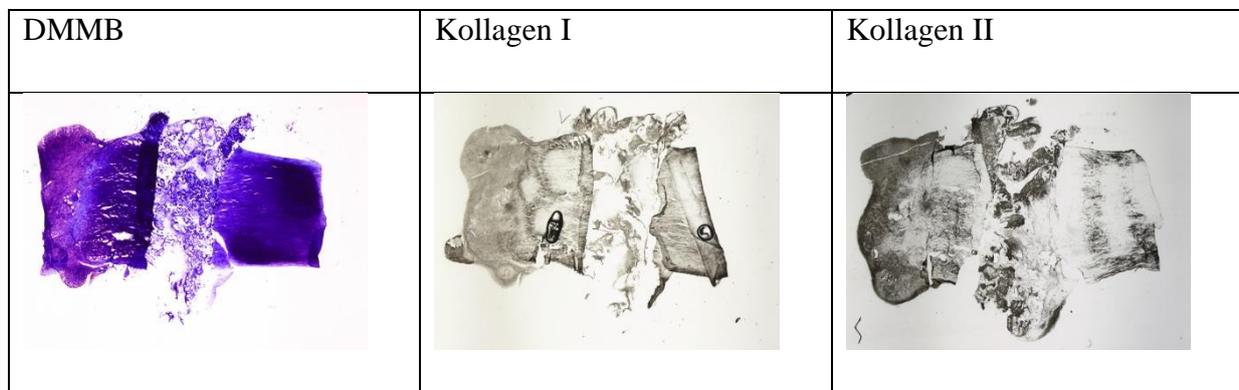


Abb. 3.4.2.1.4: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich mit fünfwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Die Zell-Matrix-Konstrukte der vaskulären Zellen zeigten eine Zunahme von Kollagen I und II über den Zeitraum der Kultivierung in der immunhistochemischen Färbung. Je länger eine Vorkultur dauerte, desto fortgeschrittener waren die Integration sowie die Differenzierung der Zell-Matrix-Konstrukte im Meniskusring.

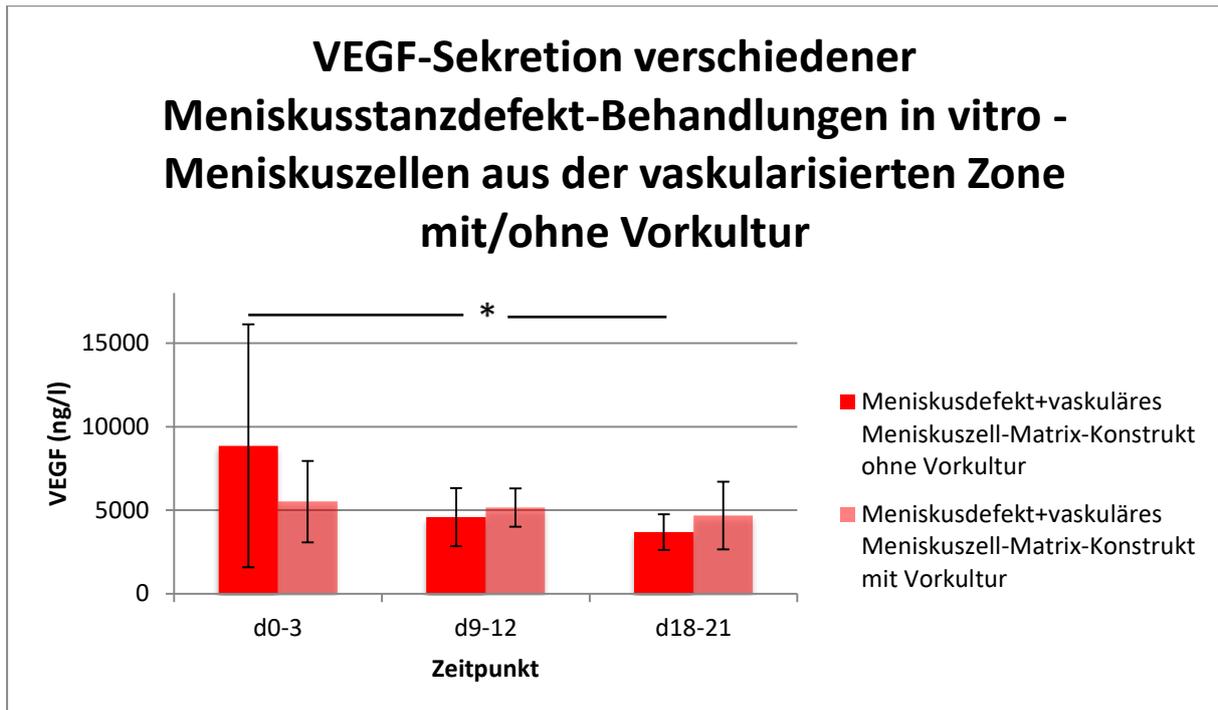


Abb. 3.4.2.1.5: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus einem Meniskusring, gefüllt mit Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich des Meniskus ohne Vorkultur und mit zweiwöchiger Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Ohne Vorkultur sah man eine abfallende VEGF-Produktion, signifikant zwischen Tag 3 und Tag 21. Man erkannte mit und ohne Vorkultur zu jedem Messzeitpunkt keine größeren Unterschiede bezüglich der VEGF-Produktion.

3.4.2.2 Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich

Makroskopische Bilder eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich ohne Vorkultur, mit zweiwöchiger und mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

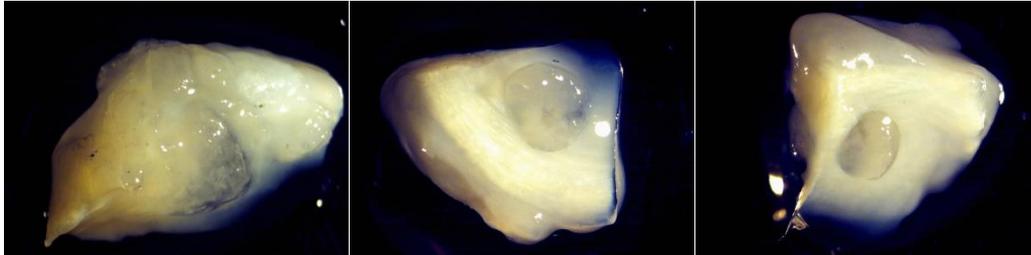


Abb. 3.4.2.2.1: Makroskopische Aufnahmen von Meniskusringen mit Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem vaskulären Bereich des Meniskus. Links: Ohne Vorkultur. Mitte: Mit zweiwöchiger Vorkultur. Rechts: Mit fünfwöchiger Vorkultur.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich ohne Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

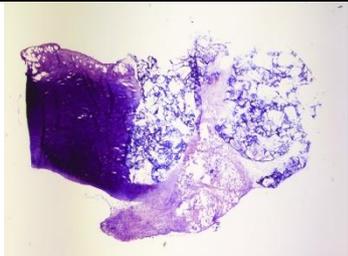
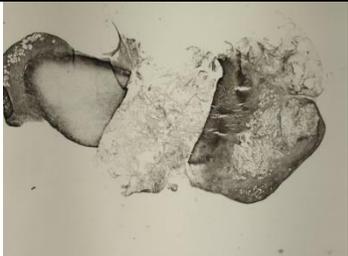
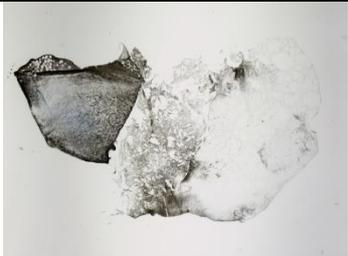
DMMB	Kollagen I	Kollagen II
		

Abb. 3.4.2.2.2: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich ohne Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich mit zweiwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:



Abb. 3.4.2.2.3: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich mit zweiwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

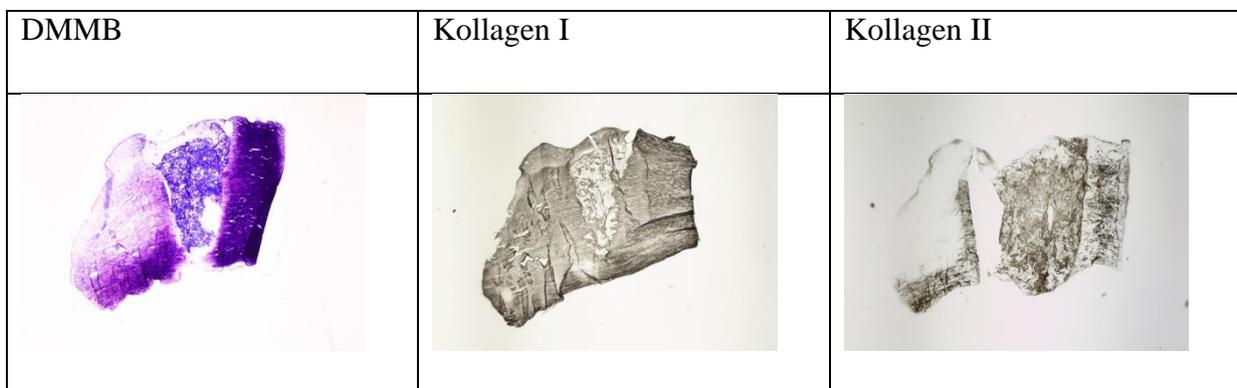


Abb. 3.4.2.2.4: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich mit fünfwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Zell-Matrix-Konstrukte der avaskulären Zellen hatten eine Integration in dem Meniskusdefekt mit Bildung der Kollagensubtypen I und II. Die Differenzierung verbesserte sich mit der Dauer der Vordifferenzierung.

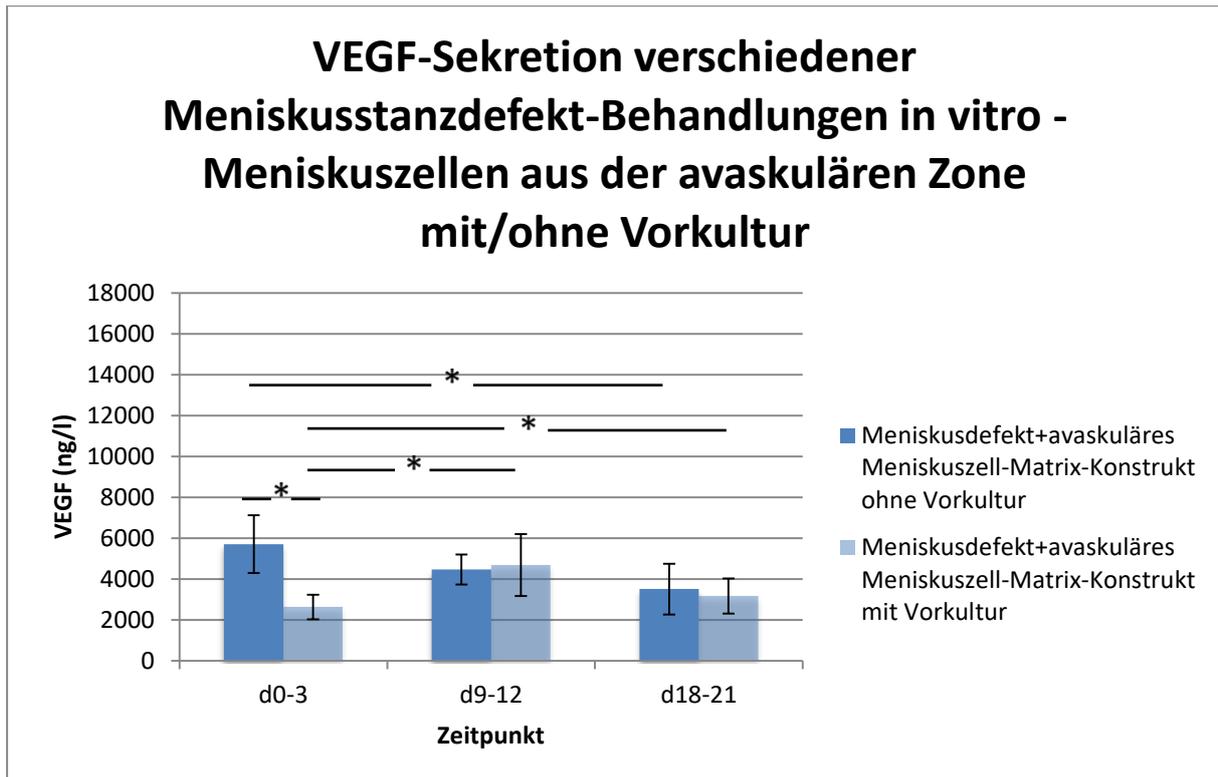


Abb. 3.4.2.2.5: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus einem Meniskusring, gefüllt mit Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen aus dem avaskulären Bereich des Meniskus ohne Vorkultur und mit zweiwöchiger Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Avaskuläre Meniskuszell-Matrix Konstrukte in einem Meniskusdefekt zeigten ohne Vorkultur eine signifikant abfallende VEGF-Sekretion über die Zeit. Initial war eine höhere VEGF Freisetzung der Konstrukte ohne Vorkultur gegenüber mit Vorkultur erkennbar, was jedoch an den folgenden Zeitpunkten nicht mehr detektierbar war.

3.4.2.3 Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich

Makroskopische Bilder eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich ohne Vorkultur, mit zweiwöchiger und mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

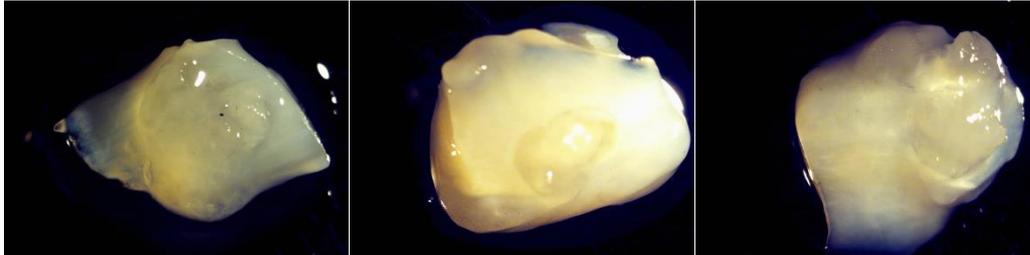


Abb. 3.4.2.3.1: Makroskopische Aufnahmen von Meniskusringen mit Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich des Meniskus. Links: Ohne Vorkultur. Mitte: Mit zweiwöchiger Vorkultur. Rechts: Mit fünfwöchiger Vorkultur.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich ohne Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

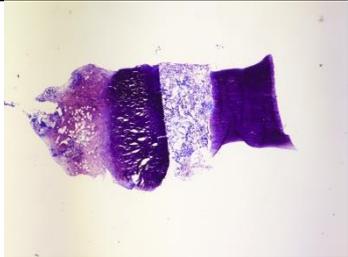
DMMB	Kollagen I	Kollagen II
		

Abb. 3.4.2.3.2: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich ohne Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich mit zweiwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

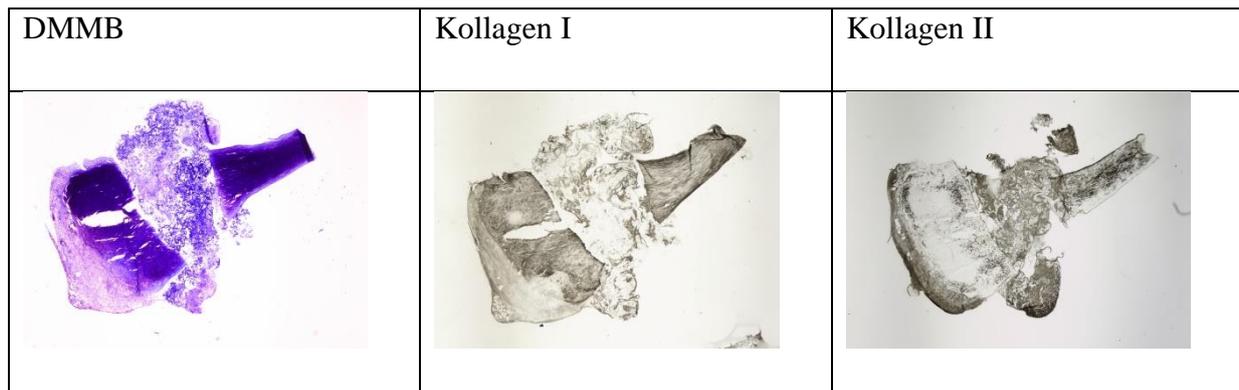


Abb. 3.4.2.3.3: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich mit zweiwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

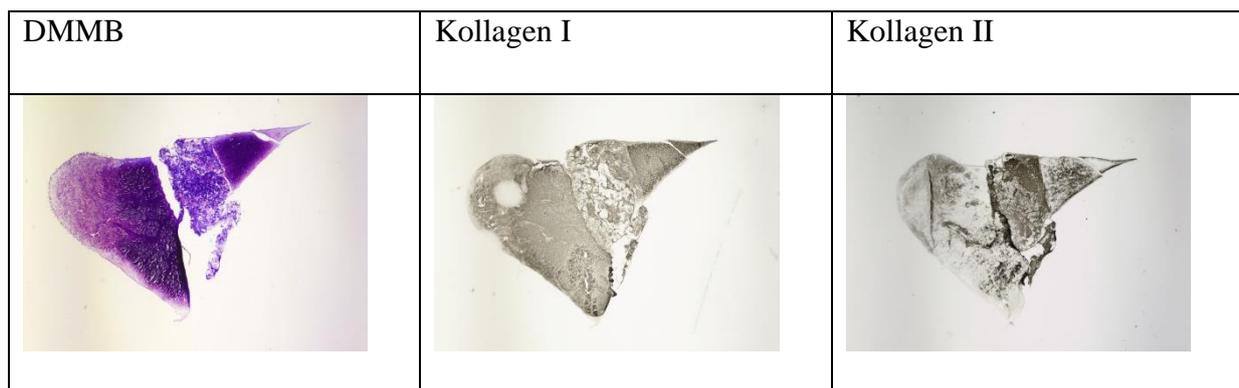


Abb. 3.4.2.3.4: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich mit fünfwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Gemischtzellige Matrixkonstrukte wiesen eine Integration in den Meniskusdefekt auf und zeigten abhängig der Vorkultur eine steigende Kollagen I- und II-Produktion.

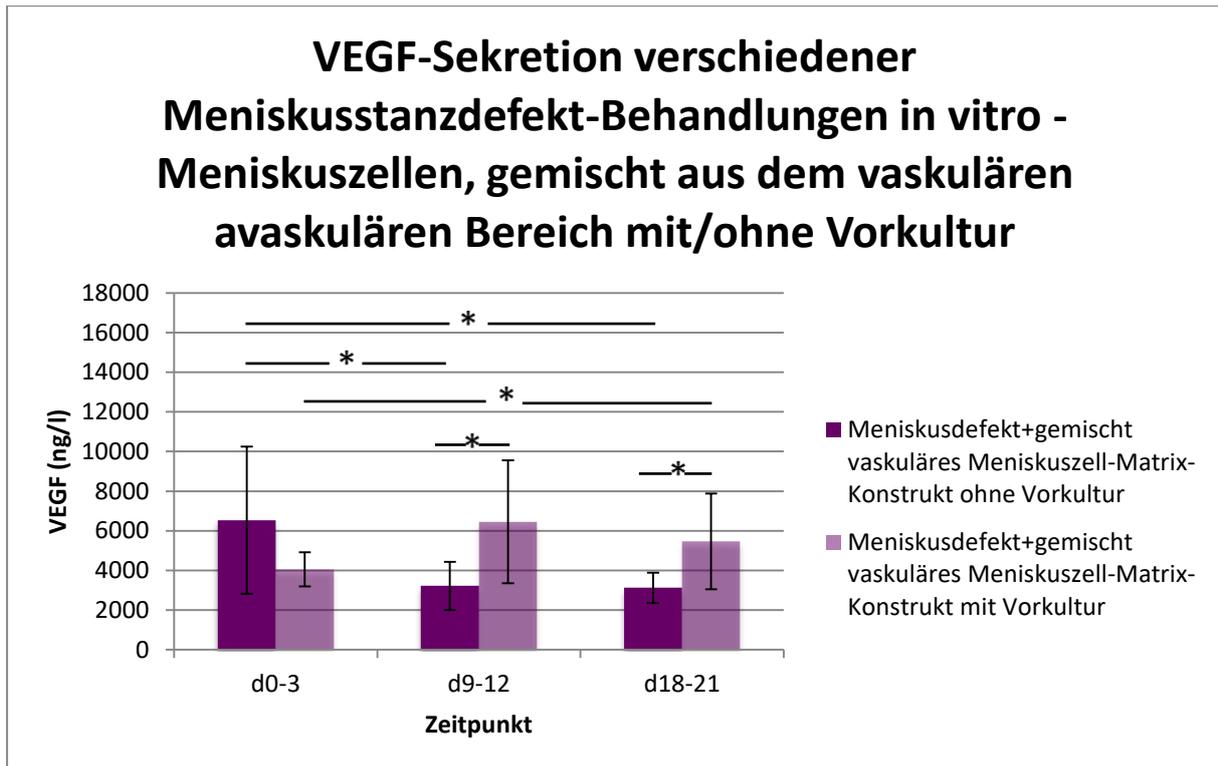


Abb. 3.4.2.3.5: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus einem Meniskusring, gefüllt mit Zell-Matrix-Konstrukt mit Meniskuszellen, gemischt aus dem vaskulären und avaskulären Bereich des Meniskus ohne Vorkultur und mit zweiwöchiger Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Die VEGF-Produktion zeigte ohne Vorkultur eine Abnahme über die Zeit, mit Vorkultur eine leichte Zunahme. Insgesamt wurde ohne Vorkultur mehr VEGF über den Zeitraum produziert.

3.4.2.4 Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen

Makroskopische Bilder eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen ohne Vorkultur, mit zweiwöchiger und mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

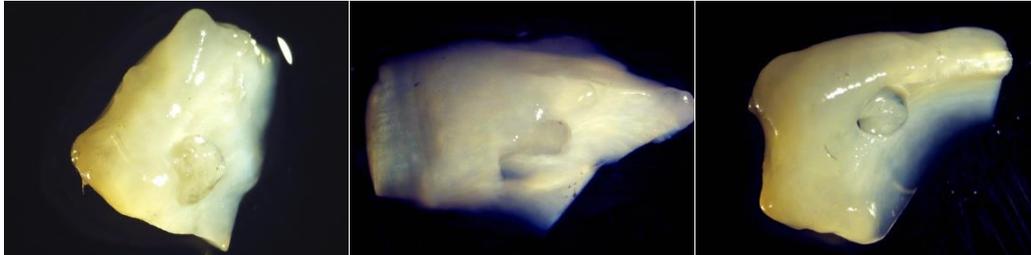


Abb. 3.4.2.4.1: Makroskopische Aufnahmen von Meniskusringen mit Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen. Links: Ohne Vorkultur. Mitte: Mit zweiwöchiger Vorkultur. Rechts: Mit fünfwöchiger Vorkultur.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen ohne Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:

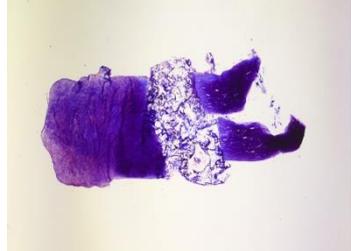
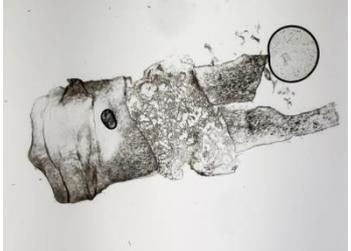
DMMB	Kollagen I	Kollagen II
		

Abb. 3.4.2.4.2: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen ohne Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen mit zweiwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:



Abb. 3.4.2.4.3: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen mit zweiwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem **Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen mit fünfwöchiger Vorkultur**, nach dreiwöchiger Differenzierung:



Abb. 3.4.2.4.4: Histologische Aufnahmen eines Meniskusringes, behandelt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen mit fünfwöchiger Vorkultur, nach dreiwöchiger Differenzierung in jeweiliger Färbung.

Mesenchymale Stammzell-Matrix-Konstrukte wiesen nach der Differenzierungszeit eine Integration in den Defekt auf, die Qualität der Kollagen I- und II-Produktion war positiv abhängig von der Vordifferenzierungszeit.

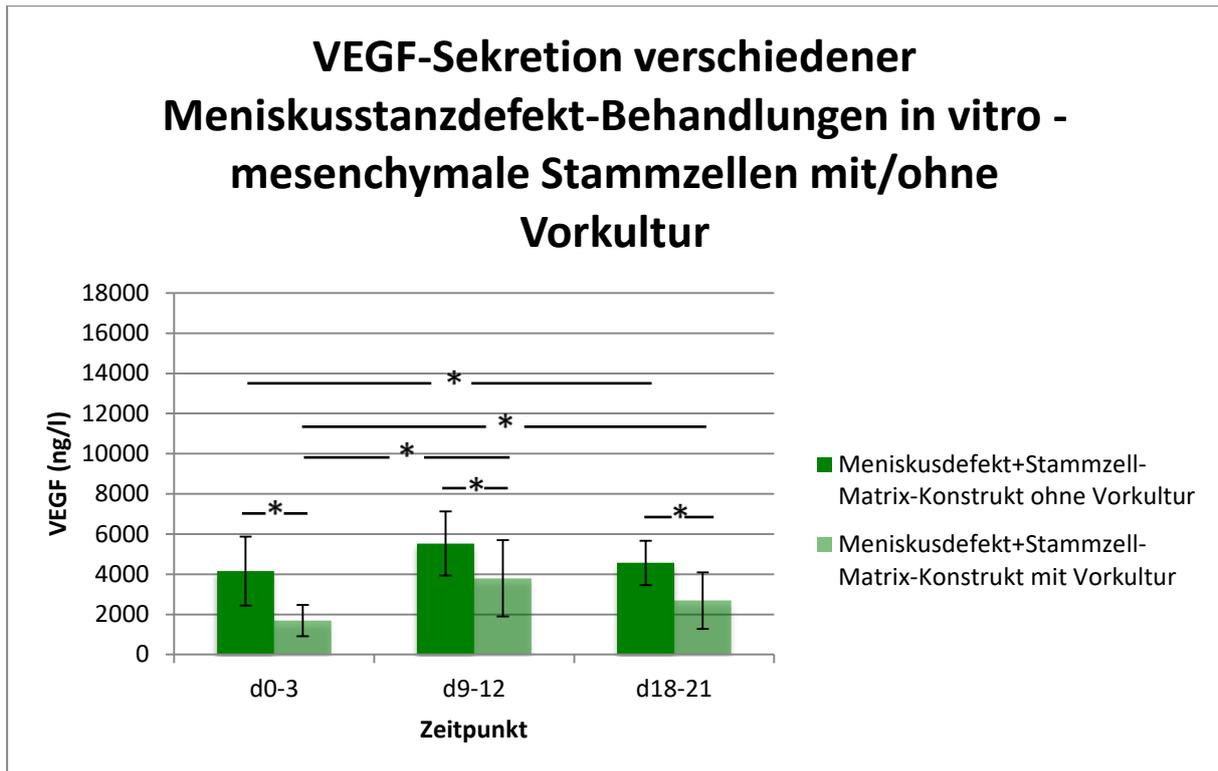


Abb. 3.4.2.4.5: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion aus einem Meniskusring, gefüllt mit Zell-Matrix-Konstrukt mit mesenchymalen Stammzellen ohne Vorkultur und mit zweiwöchiger Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Sowohl mit als auch ohne Vorkultur gab es eine Steigerung der VEGF-Produktion während der Differenzierungszeit. Ohne Vorkultur wurde mehr VEGF produziert als mit Vorkultur.

3.4.3 Zusammenfassung der Meniskusringe

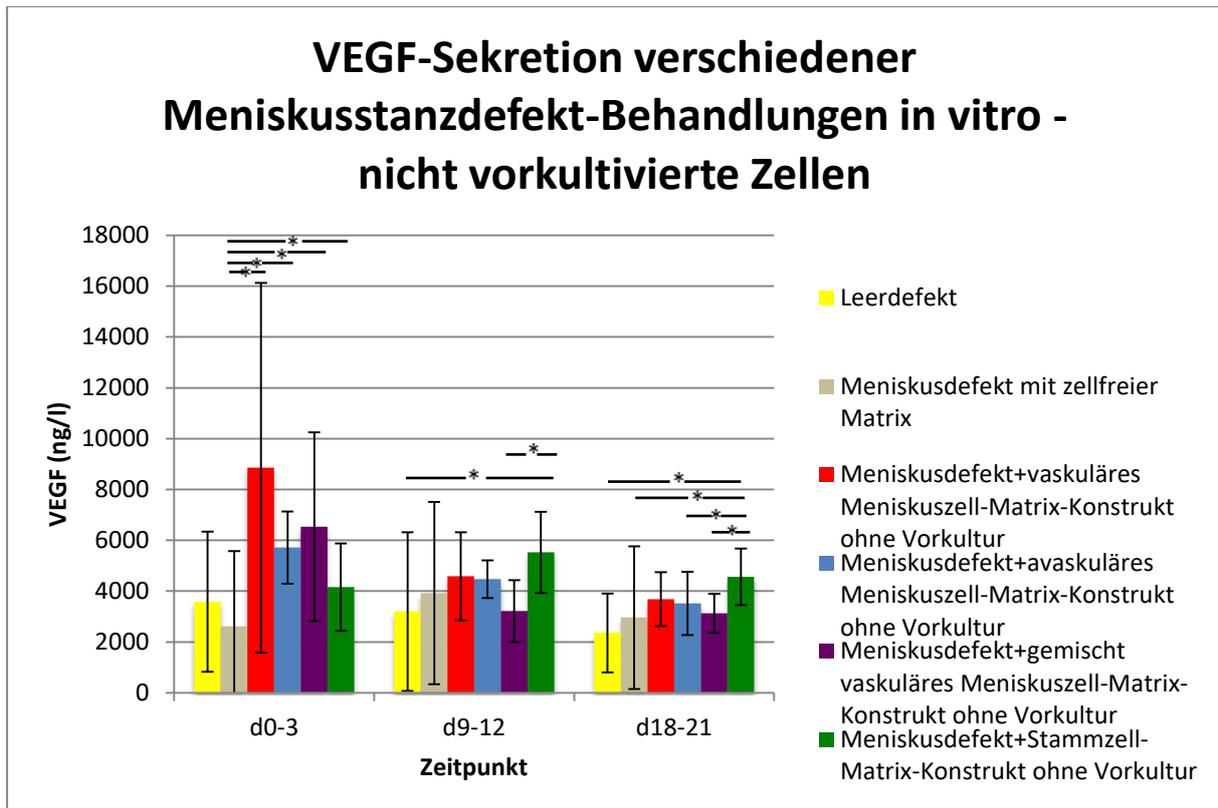


Abb. 3.4.3.1: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion verschiedener Meniskusstanzdefekt-Behandlungen ohne Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

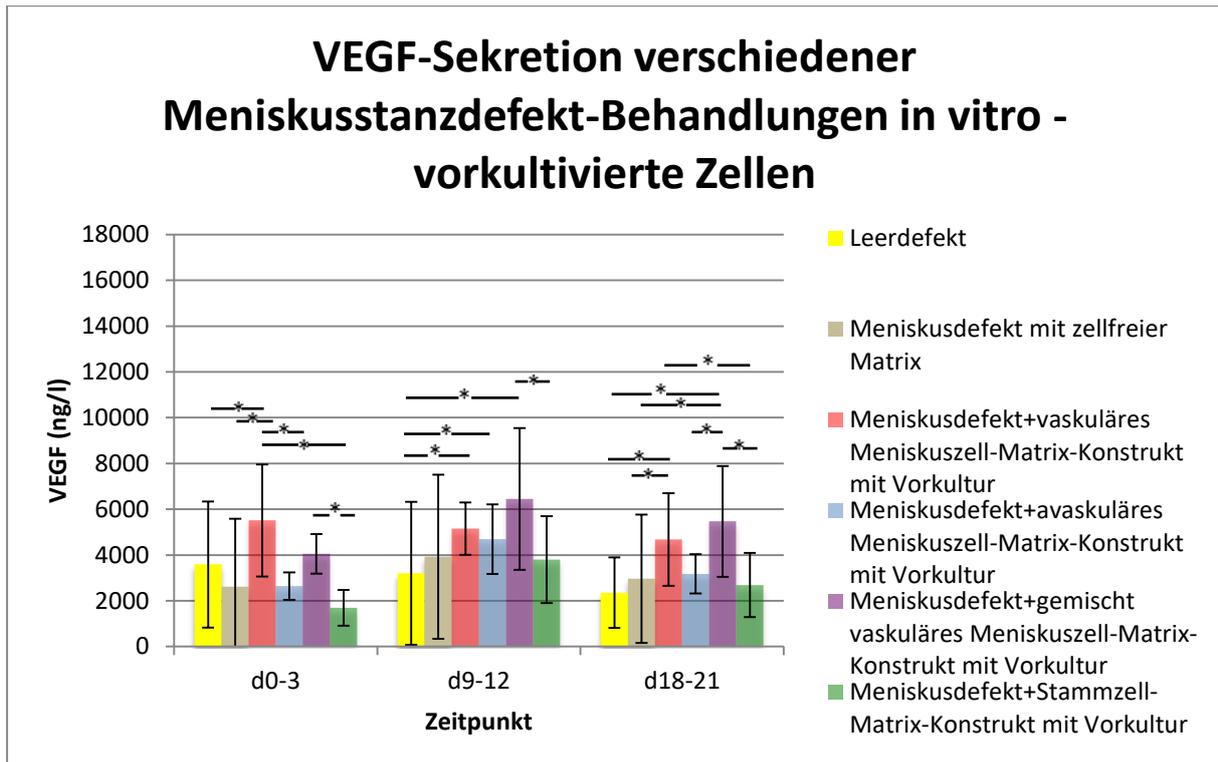


Abb. 3.4.3.2: Vergleichende statistische Auswertung der VEGF-Sekretion verschiedener Meniskusstanzdefekt-Behandlungen mit zweiwöchiger Vorkultur zu den Zeitintervallen Tag 0-3, Tag 9-12 und Tag 18-21. Das Signifikanzniveau * beträgt $p < 0,05$.

Zusammenfassend zeigte sich immunhistochemisch bei allen Zelllinien-Matrix-Konstrukten eine gute Integration der Matrix in die Meniskusringe. Die Kollagen I- und II-Bildung ist direkt abhängig von der Dauer der Vordifferenzierung der Zell-Matrix-Konstrukte. Je länger die Vordifferenzierung andauerte, desto besser waren die Integration und die Kollagendifferenzierung im Meniskusring.

In den VEGF-ELISA-Tests zeigte sich, dass ein Meniskusring alleine, als auch mit einer zellfreien Matrix, auf stabilem Niveau VEGF produziert.

Während die nicht vorkultivierten Meniskuszellkonstrukte im Meniskusdefekt eher abfallende VEGF-Sekretionen zeigten, waren vorkultivierte Konstrukte bezüglich der VEGF-Sekretion stabil oder leicht ansteigend. Vor allem bei den vorkultivierten, gemischten Meniskuszell-Matrixkonstrukten war die VEGF-Sekretion gegen Ende der Kultivierung höher als bei den nicht vorkultivierten.

Bei den Stammzellen zeigten die vorkultivierten und nicht vorkultivierten Konstrukte ansteigende VEGF-Werte über die Zeit. Die nicht vorkultivierten zeigten dabei höhere Werte.

Alle nicht vorkultivierten Zelllinien wiesen im ersten Differenzierungsintervall signifikant höhere VEGF Werte gegenüber dem leerbelassenen Meniskusdefekt auf.

Am Tag 18-21 zeigten die nicht vorkultivierten Stammzellkonstrukte signifikant höhere Werte als der Leerdefekt und alle anderen zellfreien oder zellbeladenen Behandlungsformen.

Bei den vorkultivierten Gruppen wiesen gegen Ende der Beobachtung die gemischtvaskularisierten Meniskuszell-Matrix-Konstrukte im Defekt die höchste VEGF-Sekretion auf, signifikant mehr als der Leerdefekt und alle anderen Behandlungsformen.

4. Diskussion

Aufgrund der entscheidenden Rolle der Gefäßversorgung für die Meniskusreparatur wurde in der vorliegenden Arbeit der VEGF untersucht, welcher die Gefäßversorgung stimuliert. Bei humanen Meniskuszellaggregaten zeigten vaskuläre und avaskuläre Meniskuszellaggregate eine Steigerung der VEGF-Sekretion während der Differenzierung. Dagegen nahm die VEGF-Sekretion bei Aggregaten, gemischt aus vaskulären und avaskulären Meniskuszellen, im Verlauf ab. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine intrinsische Gegenregulation sein, wenn beide Zelllinien gemischt sind. Humane mesenchymale Stammzellaggregate zeigten ähnliche Ergebnisse wie mesenchymale Stammzellaggregate des Kaninchens in Bezug auf die VEGF-Sekretion über die Zeit. Es konnte gezeigt werden, dass Kaninchenzellen, wenn auch nur eingeschränkt, repräsentativ für humane Zellen für die Analyse der verschiedenen Zelllinien hinsichtlich der VEGF-Produktion und Sekretion über die Zeit verwendet werden können. Gegen Ende der Kultivierungsphase schienen Meniskuszellen in beiden Modellen tendenziell mehr VEGF zu produzieren als MSCs. Hierbei verhielten sich vor allem die gemischtvaskulären Meniskuszellen sowie die mesenchymalen Stammzellen beider Spezies ähnlich. Es wurden verschiedene Zellarten miteinander verglichen und dabei ein Zusammenhang des unterschiedlichen Differenzierungsgrades im Laufe der chondrogenen Differenzierung auf die VEGF-Produktion nachgewiesen.

Ebenfalls wurden Interaktionen der verwendeten Zellen mit einer Gelatine-Hyaluronsäurematrix untersucht. Hierbei stellte sich eine negative Beeinflussung der Matrix auf die VEGF-Produktion heraus. Das Biomaterial auf Gelatine-Hyaluronsäurebasis reduzierte die VEGF-Sekretion über die Zeit, obwohl mehr Zellen in einem Zell-Matrix-Konstrukt enthalten waren als in einem Zellaggregat. Eine Frage wäre, ob andere Biomaterialien einen weniger negativen Einfluss auf die VEGF-Produktion hätten. Eine Polyurethan-Matrix im klinischen Einsatz konnte eine starke Induktion von Vaskularisation in die Meniskusspitze aufweisen [68]. Die Zell-Matrixkonstrukte ohne Vorkultivierung zeigten konstant höhere VEGF-Sekretionswerte über die Zeit, so dass davon ausgegangen werden muss, dass mit zunehmender chondrogener Differenzierung die VEGF-Produktion reduziert wird und diese einen negativen Einfluss auf die Induktion von Angiogenese nimmt, wie bereits in laboreigenen Versuchen festgestellt wurde [167]. Ein Meniskusring mit einem Leerdefekt sowie mit einer Leermatrix produziert konstant VEGF. Angewandt bei der Therapie eines Meniskusdefektes in vitro wiesen die Zell-Matrix-Konstrukte generell höhere

VEGF-Sekretionswerte auf. Dies könnte einerseits seine Ursache darin haben, dass Meniskusgewebe per se VEGF konstant sezerniert. Andererseits scheint das Meniskusgewebe auch die Sekretion von VEGF über die Zeit zu stabilisieren.

Bei den nicht vorkultivierten Stammzell-Matrixkonstrukten zeigten sich nach 21 Tagen signifikant erhöhte VEGF-Sekretionswerte gegenüber den anderen Zellarten, wohingegen bei den vorkultivierten Zellen die gemischt vaskulär-avaskulären Meniskuszellen signifikant höhere VEGF Werte nach 21 Tagen im Medium zeigten. Meniskusgewebe scheint also abhängig vom Differenzierungsgrad die Zunahme der VEGF-Sekretion bei Meniskuszellen oder mesenchymalen Stammzellen zu induzieren.

Eine Integration der zellbesetzten Matrices in den Meniskusdefekt war ebenfalls bei vorkultivierten zellbesetzten Matrices besser als bei nicht vorkultivierten. Trotz der gesteigerten Integration zellbesetzter Matrices mit Vorkultur in einen Meniskusdefekt, war in vorliegender Arbeit die VEGF-Produktion bei Zellmatrices mit einer Vorkultur jedoch auf einem geringeren Niveau als ohne Vorkultur. In vivo konnten Zellner und Kollegen allerdings einen Vorteil nicht-vorkultivierter mesenchymalen Kaninchenzell-Matrix-Konstrukten gegenüber Vorkultivierten nach einer Beobachtungszeit von drei Monaten ausmachen [167]. Die Vorteile, die in vivo ohne Vorkultur aufgezeigt werden konnten, könnte in der initial gesteigerten Menge des gebildeten VEGF liegen. Eine weitere Erklärung könnte die längere Beobachtungszeit von drei Monaten sein. VEGF hat einen positiven Einfluss auf die Genexpression von Kollagen I und II [61]. Bei der Annahme einer stetigen Senkung der VEGF-Produktion muss von einem Mitwirken weiterer Zytokine in vivo bei der Defektheilung ausgegangen werden. Ein Nachteil der Vorkultivierung in vivo könnte sein, dass das Zell-Matrix-Konstrukt durch die Vorkultivierung die Fähigkeit zur Interaktion mit nativen Meniskuszellen des Defektrandes verloren hat. Die hier in vitro nachgewiesene geringere Menge der VEGF-Produktion mit Vorkultur kann eine verminderte Hemmung der MMPs erklären, was damit einen verminderten Abbau von Meniskusgewebe bedeutet und somit eine Erklärung für die gesteigerte Integration mit Vorkultur darstellen würde.

Die Angiogenese ist ein weiterer Grund für die Unterschiede zwischen in vitro und in vivo, welche in den hier durchgeführten in vitro Versuchen nicht direkt untersucht wurde, sondern lediglich das angiogenetische Milieu, welches in Bezug auf VEGF geschaffen wurde. Ehrenreich untersuchte in seiner Arbeit die Gefäßeinsprossung in mit vaskulären, avaskulären Meniskuszellen und mit mesenchymalen Stammzellen besetzten Matrices anhand eines Rückenmarkkammermodells. Hierbei zeigten vordifferenzierte Zell-Matrixkonstrukte eine

vermehrte Gefäßeinsprossung gegenüber Zell-Matrixkonstrukten ohne Vorkultur. Außerdem wiesen mesenchymale Stammzell-Matrixkonstrukte ein früheres Einsprossen von Gefäßen im Gegensatz zu mit Meniskuszellen besetzten Matrices auf. Dies könnte vor allem mit der stärkeren initialen Steigerung der VEGF-Sekretion der vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukte im Gegensatz zu den nicht-vorkultivierten Konstrukten im Meniskusring zusammenhängen, da der Überwachungszeitraum in der Rückenkammer lediglich 14 Tage betrug.

Zudem zeigte sich bei vaskulären Meniskusgewebestücken eine gesteigerte Gefäßeinsprossung als bei avaskulären [101]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die in vorliegender Arbeit nachgewiesene höhere VEGF-Produktion von vaskulären Meniskuszellaggregaten im Vergleich zu avaskulären sein.

Die vorherrschende Konzentration an VEGF scheint neben weiteren Interaktionen eine Rolle bei der Defektheilung zu spielen. Zellner et al. führten auf, dass ein unselektiertes Gemisch, wie im platelet rich Plasma enthalten, nicht für das Tissue Engineering geeignet ist [167]. In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass trotz einer erhöhten VEGF-Produktion in der avaskulären Zone des Meniskus, im Vergleich zur vaskularisierten Zone, eine vermindere Heilung des Defektes beobachtet werden konnte [102]. Eine weitere Hypothese könnte sein, dass nur bestimmte VEGF-Isoformen für die Defektheilung verantwortlich sind, deren Bildung sich im Laufe der Differenzierung steigert, währenddessen die Produktion an Gesamt-VEGF sinkt. Die Rolle von VEGF bei der Meniskusregeneration bleibt jedoch ambivalent. Pufe et al mussten feststellen, dass ein VEGF beschichteter Faden im Rahmen eines Meniskusregenerationsversuchs die Meniskusheilung sogar negativ beeinflusste [114]. VEGF alleine kann keine Reparatur induzieren [178].

Ein zellgebundener Ansatz scheint hier erfolgversprechender:

Daten im eigenen Labor zeigten, dass eine Behandlung von kritischen avaskulären Meniskusdefekten im Tiermodell sowohl mit autologen Meniskuszellen als auch mit mesenchymalen Stammzellen möglich ist.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigten sich in den immunhistochemischen Untersuchungen die Meniskuszellen, hierunter vor allem die vaskulären Meniskuszellen, den mesenchymalen Stammzellen in Bezug auf Integration und Differenzierung überlegen. Für eine klinische Anwendung jedoch wäre die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen, aufgrund einer nur gering verminderten Integration in den Meniskusdefekt, gegenüber Meniskuszellen, diesen vorzuziehen. Gründe hierfür sind folgende:

Die Gewinnung von Meniskuszellen beim Menschen geht nur durch die Schaffung eines weiteren Defektes und damit einer hohen donor-side-morbidity einher.

Unter diesen Gesichtspunkten wäre eine geeignetere Zellquelle das Knochenmark. Eine Knochenmarkspunktion weist eine geringere Entnahmemorbidity auf. Die pluripotenten Stammzellen werden bereits im Rahmen von Tissue Engineering am Bewegungsapparat an z.B. Sehnen, Knochen und Gelenkknorpel verwendet und stellen einen vielversprechenden Ansatz der Meniskusreparatur dar [36][37]. Bereits Ischimura et al. konnten 1997 bei diesen Zellen eine Verbesserung der Heilung avaskulärer Läsionen in Kombination mit einem Fibrin-Clot im Gegensatz zu einem alleinigen Fibrin-Clot nachweisen [34]. Auch in vivo wurde das Reparaturvermögen eines alleinigen Fibrin-Clots und eines Fibrin-Clots in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen verglichen. Beide Ansätze führten zu keiner entscheidenden Verbesserung. Ein Grund hierfür könnte sein, unter Berücksichtigung der möglichen Reparatoren in Kombination beider [34], dass der Fibrin-Clot nicht genügend Schutz vor den intraartikulären Belastungen bietet.

Angele et al. konnten allerdings die Reparatur eines kombinierten vaskulär-avaskulären Meniskusdefektes in der Pars intermedia des Meniskus durch die Implantation einer 14-tägig vorkultivierten, mit vorgereinigten und bis zur Konfluenz angezüchteten mesenchymalen Stammzellen besetzte Gelatine-Hyaluronsäurematrix nachweisen. Nach dreimonatiger in vivo-Laufzeit zeigte sich hierbei eine Defektfüllung mit meniskusartigem Gewebe und guter Integration dieses Gewebes in das umliegende Defektareal. In der Kontrollgruppe, bei der lediglich eine zellfreie Gelatine-Hyaluronsäurematrix implantiert wurde, zeigte sich keine Ausheilung [168].

Aufgrund des geringen Anteils von pluripotenten Knochenmarksstammzellen am Knochenmark von 0,01% bis 0,001%, ist auch bei Verwendung der mesenchymalen Stammzellen ein zweizeitiges Vorgehen notwendig. Zum Erreichen einer ausreichenden Zellzahl ist eine vorherige Isolation und anschließende Implantation der gereinigten pluripotenten mesenchymalen Stammzellen bei der Behandlung von Meniskuläsionen anzustreben [35]. Vorteile der mesenchymalen Stammzellen zur Meniskusreparatur sind des Weiteren die relativ einfache Gewinnung an mehreren Körperstellen, die ausreichende Menge, die nicht zu erwartende Immunreaktion bei autologer Transplantation und die ethisch vertretbare Durchführung. MSCs können im Rahmen der Meniskusregeneration auf zwei unterschiedliche Arten wirken. Einerseits können sie in die Regeneratzelle selbst differenzieren, andererseits können sie auch bioaktive Substanzen sezernieren [117]. MSCs

produzieren dabei auch VEGF [118]. In einem kontrollierten Stammzell-gebundenen Ansatz scheint eine regulierte VEGF-Sekretion aus Stammzell-Matrix Konstrukt wahrscheinlich.

Eine zukünftige Behandlung eines Meniskusdefektes im Rahmen von Tissue Engineering könnte folgendermaßen aussehen:

Dem am Meniskus verletzten Patienten wird Knochenmark am Beckenkamm entnommen. Die punktierten Zellen werden gereinigt, kultiviert, amplifiziert, in eine Matrix überführt und diese einer Differenzierung zugeführt. Dieses Zell-Matrix-Konstrukt wird nach Beendigung der Differenzierung arthroskopisch nach Anfrischen der Defektränder in den Defekt eingebracht.

Weitere Forschungsideen zur Verbesserung der Matrices sollten im Hinblick auf ein leichteres operatives Handling in der Stabilisierung der Matrices liegen, ohne dass die gesteigerte Stabilität eine Degeneration des Knorpels hervorruft.

Ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Integration des Zell-Matrix-Konstruktes in den Meniskusdefekt könnte *in vivo*, neben dem Verzicht einer Vorkultur, die Förderung von Angiogenese-fördernden Substanzen wie z.B. VEGF sein [102][172][114][54][111]. Ob nun die eingebrachten Zellen selbst als Reparaturzellen fungieren oder ob die von ihnen produzierten chondrogenen Faktoren Reparaturzellen anlocken, ist noch nicht geklärt. Hierzu müssen noch weitere Untersuchungen in Bezug auf die verwendeten Zellen und die benötigten Angiogenesefaktoren mit deren Kinetik zur Meniskusreparatur erfolgen.

Die vorliegende Arbeit zeigte Limitationen auf. Es handelt sich um ein komplexes vielschichtiges multifaktorielles Modell. Zudem war aufgrund der eingeschränkten Differenzierung der MSCs der Kaninchenzellen die zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren nötig.

Die Meniskusreparatur ist komplex und es muss weiterhin untersucht werden, welche angiogenesefördernden und -hemmenden Substanzen während der *in-vivo*-Reparatur vorherrschen, deren Effekt auf die Zellaktivitäten wie auch deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix. VEGF ist dabei nur ein Faktor.

5. Zusammenfassung

Meniskusläsionen stellen besonders im avaskulären Bereich ein schwer behandelbares Problem dar. Trotz neuerer Methoden neben der ursprünglichen arthroskopischen Entfernung des geschädigten Meniskusteils führen diese allesamt zu präarthrotischen Deformitäten.

Um diese Deformitäten zu minimieren, sollte eine Ausheilung des Defektes angestrebt werden, um damit Meniskusgewebe zu schonen. Die Etablierung des Tissue Engineering bietet diese Möglichkeiten. Frühere Arbeiten aus dem eigenen Labor konnten als geeignetes Trägermaterial für das Tissue Engineering die Gelatine-Hyaluronsäurematrices entwickelt werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Zellen die besten Eigenschaften zur Differenzierung in der Matrix haben und sich im Zusammenspiel mit der Matrix am besten in einen Meniskusdefekt integrieren. Parameter hierfür waren der VEGF, der mittels ELISA-Tests bestimmt wurde sowie immunhistochemische Untersuchungen auf die im Meniskus vorherrschenden Kollagentypen I und II. Die untereinander verglichenen Zellen waren Meniskuszellen aus der vaskulären, aus der avaskulären, aus der gemischtvaskulären Zone sowie mesenchymale Stammzellen. Alle Versuche wurden in vitro durchgeführt.

Die ersten beiden Versuchsteile beschäftigten sich mit der Frage, ob sich Kaninchenzellen analog zu Zellen humanen Ursprungs in Bezug auf oben genannte Parameter verhalten, so dass die weiteren Versuche dieser Arbeit als reine tierexperimentelle Versuche fortgeführt werden konnten. Die Arbeit konnte diese Hypothese größtenteils bestätigen.

Im dritten Versuchsteil wurden mit Kaninchenzellen verschiedenen Ursprungs aus dem Meniskus sowie mit mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens besetzte Matrices untersucht. Diese Zell-Matrix-Konstrukte wurden zudem unterschieden in Bezug auf eine Vorkultur. Eine Vorkultur zeigte verminderte Werte bezüglich der VEGF-Produktion, jedoch eine gesteigerte Bildung der untersuchten Kollagentypen. Die Kollagen-Hyaluronsäurematrix scheint einen hemmenden Effekt auf die VEGF-Bildung zu haben. Zu erwähnen ist zudem, dass mesenchymale Stammzellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien kein Kollagen II in der Matrix ausbildeten, mesenchymale Stammzellaggregate jedoch schon.

Der vierte Versuchsteil beschäftigte sich mit der Integration der Zell-Matrix-Konstrukte in einen Meniskusdefekt. Die Integration der Zell-Matrix-Konstrukte sowie die Kollagen I- und II-Bildung war hierbei bei allen Zelllinien positiv abhängig von einer Vorkultur. Ein Meniskusring mit Leerdefekt sowie gefüllt mit einer zellfreien Matrix produzierte auf stabilem Niveau VEGF. Besetzt mit einem Zell-Matrix-Konstrukt produzierte ein Meniskusring mehr VEGF als ein Meniskusring mit leerbelassenem Defekt. Im Zusammenspiel mit einem Meniskusring wurden bei vorkultivierten Zell-Matrix-Konstrukten niedrigere Werte der VEGF-Produktion als bei nicht vorkultivierten bestimmt.

Trotz der immunhistochemisch nachgewiesenen besseren Integration vorkultivierter Zell-Matrix-Konstrukte in einen Meniskusdefekt zeigten vorkultivierte Zell-Matrix-Konstrukte sowohl alleine als auch im Zusammenspiel mit einem Meniskusdefekt eine geringere VEGF-Produktion im Vergleich zu nicht vorkultivierten Konstrukten.

VEGF ist ein Faktor unter vielen in der Defektheilung eines Meniskus. Weitere Forschung muss neben dem Faktor VEGF andere Zytokine in der Behandlung avaskulärer Meniskusläsionen untersuchen.

6. Literatur

- [1] Statistisches Bundesamt: Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG Statistik): Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Dase Mix der vollstationären Patienten. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt 2014
- [2] H. Kurosawa, T. Fukubayashi, and H. Nakajima, “Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci.,” *Clinical orthopaedics and related research*, no. 149, pp. 283–90, Jun. 1980.
- [3] B. B. Seedhom and K. Terayama, “Knee forces during the activity of getting out of a chair with and without the aid of arms.,” *Biomedical engineering*, vol. 11, no. 8, pp. 278–82, Aug. 1976.
- [4] A. S. Voloshin and J. Wosk, “Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study.,” *Journal of biomedical engineering*, vol. 5, no. 2, pp. 157–61, Apr. 1983.
- [5] C. G. Armstrong and V. C. Mow, “Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content.,” *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 64, no. 1, pp. 88–94, Jan. 1982.
- [6] R. B. Bourne, J. B. Finlay, P. Papadopoulos, and P. Andreae, “The effect of medial meniscectomy on strain distribution in the proximal part of the tibia.,” *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 66, no. 9, pp. 1431–7, Dec. 1984.
- [7] T. Fukubayashi and H. Kurosawa, “The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints.,” *Acta orthopaedica Scandinavica*, vol. 51, no. 6, pp. 871–9, Dec. 1980.
- [8] P. S. Walker and M. J. Erkman, “The role of the menisci in force transmission across the knee.,” *Clinical orthopaedics and related research*, no. 109, pp. 184–92, Jan. 1975.
- [9] D. E. Cooper, S. P. Arnoczky, and R. F. Warren, “Meniscal repair.,” *Clinics in sports medicine*, vol. 10, no. 3, pp. 529–48, Jul. 1991.

-
- [10] B. L. O'Connor, "The mechanoreceptor innervation of the posterior attachments of the lateral meniscus of the dog knee joint.," *Journal of anatomy*, vol. 138 (Pt 1, pp. 15–26, Jan. 1984.
- [11] A. S. Wilson, P. G. Legg, and J. C. McNeur, "Studies on the innervation of the medial meniscus in the human knee joint.," *The Anatomical record*, vol. 165, no. 4, pp. 485–91, Dec. 1969.
- [12] T. Fukubayashi, P. A. Torzilli, M. F. Sherman, and R. F. Warren, "An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation, and torque.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 64, no. 2, pp. 258–64, Feb. 1982.
- [13] H. H. Hsieh and P. S. Walker, "Stabilizing mechanisms of the loaded and unloaded knee joint.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 58, no. 1, pp. 87–93, Jan. 1976.
- [14] I. M. Levy, P. A. Torzilli, and R. F. Warren, "The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 64, no. 6, pp. 883–8, Jul. 1982.
- [15] S. C. Shoemaker and K. L. Markolf, "The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee. Effects of partial versus total excision.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 68, no. 1, pp. 71–9, Jan. 1986.
- [16] K. Nakata, K. Shino, M. Hamada, T. Mae, T. Miyama, H. Shinjo, S. Horibe, K. Tada, T. Ochi, and H. Yoshikawa, "Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 391 Suppl, pp. S208–18, Oct. 2001.
- [17] M. A. Sweigart and K. A. Athanasiou, "Toward tissue engineering of the knee meniscus.," *Tissue engineering*, vol. 7, no. 2, pp. 111–29, Apr. 2001.
- [18] H. S. Cheung, "Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci.," *Connective tissue research*, vol. 16, no. 4, pp. 343–56, Jan. 1987.
-

-
- [19] G. M. Peretti, E. M. Caruso, M. A. Randolph, and D. J. Zaleske, "Meniscal repair using engineered tissue.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 19, no. 2, pp. 278–85, Mar. 2001.
- [20] P. Ghosh and T. K. Taylor, "The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 224, pp. 52–63, Nov. 1987.
- [21] L. A. Setton, F. Guilak, E. W. Hsu, and T. P. Vail, "Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 367 Suppl, pp. S254–72, Oct. 1999.
- [22] F. N. Ghadially, I. Thomas, N. Yong, and J. M. Lalonde, "Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages.," *Journal of anatomy*, vol. 125, no. Pt 3, pp. 499–517, Mar. 1978.
- [23] F. N. Ghadially, J. M. Lalonde, and J. H. Wedge, "Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint.," *Journal of anatomy*, vol. 136, no. Pt 4, pp. 773–91, Jun. 1983.
- [24] R. R. Miller and P. A. Rydell, "Primary culture of microvascular endothelial cells from canine meniscus.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 11, no. 6, pp. 907–11, Nov. 1993.
- [25] C. A. McDevitt and R. J. Webber, "The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 252, pp. 8–18, Mar. 1990.
- [26] S. P. Arnoczky and R. F. Warren, "Microvasculature of the human meniscus.," *The American journal of sports medicine*, vol. 10, no. 2, pp. 90–5.
- [27] R. Scapinelli, "Studies on the vasculature of the human knee joint.," *Acta anatomica*, vol. 70, no. 3, pp. 305–31, Jan. 1968.
- [28] W. Petersen and B. Tillmann, "Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study.," *Acta orthopaedica Scandinavica*, vol. 66, no. 4, pp. 308–12, Aug. 1995.

-
- [29] L. S. Wilkinson and J. C. Edwards, "Microvascular distribution in normal human synovium.," *Journal of anatomy*, vol. 167, pp. 129–36, Dec. 1989.
- [30] D. Amiel, M. F. Abel, J. B. Kleiner, R. L. Lieber, and W. H. Akeson, "Synovial fluid nutrient delivery in the diarthral joint: an analysis of rabbit knee ligaments.," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 4, no. 1, pp. 90–5, Jan. 1986.
- [31] A. McAlinden, J. Dudhia, M. C. Bolton, P. Lorenzo, D. Heinegård, and M. T. Bayliss, "Age-related changes in the synthesis and mRNA expression of decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage.," *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, vol. 9, no. 1, pp. 33–41, Jan. 2001.
- [32] N. Wülker, "Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie," 2005, p. S. 114.
- [33] G. G. Poehling, D. S. Ruch, and S. J. Chabon, "The landscape of meniscal injuries.," *Clinics in sports medicine*, vol. 9, no. 3, pp. 539–49, Jul. 1990.
- [34] M. Ishimura, H. Ohgushi, T. Habata, S. Tamai, and Y. Fujisawa, "Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part I: Experimental study.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 13, no. 5, pp. 551–7, Oct. 1997.
- [35] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–7, Apr. 1999.
- [36] S. P. Arnoczky, "Building a meniscus. Biologic considerations.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 367 Suppl, pp. S244–53, Oct. 1999.
- [37] F. P. Barry, "Mesenchymal stem cell therapy in joint disease.," *Novartis Foundation symposium*, vol. 249, pp. 86–96; discussion 96–102, 170–4, 239–41, Jan. 2003.
- [38] De Luca F and J. Baron, "Control of Bone Growth by Fibroblast Growth Factors.," *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, vol. 10, no. 2, pp. 61–65, Mar. 1999.
-

-
- [39] I. H. Hung, K. Yu, K. J. Lavine, and D. M. Ornitz, "FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod.," *Developmental biology*, vol. 307, no. 2, pp. 300–13, Jul. 2007.
- [40] E. L. Radin and R. M. Rose, "Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 213, pp. 34–40, Dec. 1986.
- [41] S. P. Arnoczky and R. F. Warren, "The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog.," *The American journal of sports medicine*, vol. 11, no. 3, pp. 131–41.
- [42] C. E. Henning, M. A. Lynch, and J. R. Clark, "Vascularity for healing of meniscus repairs.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 3, no. 1, pp. 13–8, Jan. 1987.
- [43] I. Guisasola, J. Vaquero, and F. Forriol, "Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 395, pp. 227–33, Feb. 2002.
- [44] Z. N. Zhang, K. Y. Tu, Y. K. Xu, W. M. Zhang, Z. T. Liu, and S. H. Ou, "Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 4, no. 3, pp. 151–9, Jan. 1988.
- [45] Z. Zhang, J. A. Arnold, T. Williams, and B. McCann, "Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats.," *The American journal of sports medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 35–41.
- [46] J. L. Cook and D. B. Fox, "A novel bioabsorbable conduit augments healing of avascular meniscal tears in a dog model.," *The American journal of sports medicine*, vol. 35, no. 11, pp. 1877–87, Nov. 2007.
-

-
- [47] R. D. Esser, "Arthroscopic meniscus repair: the easy way.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 9, no. 2, pp. 231–3, Jan. 1993.
- [48] S. A. Rodeo and R. F. Warren, "Meniscal repair using the outside-to-inside technique.," *Clinics in sports medicine*, vol. 15, no. 3, pp. 469–81, Jul. 1996.
- [49] M. F. van Trommel, P. T. Simonian, H. G. Potter, and T. L. Wickiewicz, "Arthroscopic meniscal repair with fibrin clot of complete radial tears of the lateral meniscus in the avascular zone.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 14, no. 4, pp. 360–5.
- [50] S. Horibe, K. Shino, A. Maeda, N. Nakamura, N. Matsumoto, and T. Ochi, "Results of isolated meniscal repair evaluated by second-look arthroscopy.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 12, no. 2, pp. 150–5, Apr. 1996.
- [51] R. G. Stone and G. A. Miller, "A technique of arthroscopic suture of torn menisci.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 1, no. 4, pp. 226–32, Jan. 1985.
- [52] M. Maruyama, "The all-inside meniscal suture technique using new instruments.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 12, no. 2, pp. 256–8, Apr. 1996.
- [53] C. D. Morgan, "The 'all-inside' meniscus repair.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 7, no. 1, pp. 120–5, Jan. 1991.

-
- [54] T. Pufe, B. Kurz, W. Petersen, D. Varoga, R. Mentlein, S. Kulow, A. Lemke, and B. Tillmann, "The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system.," *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, vol. 187, no. 5–6, pp. 461–72, Dec. 2005.
- [55] Frequenzstatistik der Kassenärztlichen Bundesvereinigung. 1996.
- [56] Lintner S, Shawen S, Lohnes J, et al. Local anesthesia in outpatient knee arthroscopy: a comparison of efficacy and cost. *Arthroscopy* 1996;12:482-8.
- [57] Rockborn P, Hamberg P, Gillquist J. Arthroscopic meniscectomy: treatment costs and postoperative function in a historical perspective. *Acta Orthop Scand* 2000;71:455-60.
- [58] Triesmann HW, Jr. Knee arthroscopy: a cost analysis of general and local anesthesia. *Arthroscopy* 1996;12:60-3.
- [59] Dandy DJ. The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:628-33.
- [60] Poehling GG, Ruch DS, Chabon SJ. The landscape of meniscal injuries. *Clin Sports Med* 1990;9:539-49.
- [61] R. Esparza, A. R. Gortazar, and F. Forriol, "Cell study of the three areas of the meniscus: Effect of growth factors in an experimental model in sheep.," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, Mar. 2012.
- [62] M. D. Brown and O. Hudlicka, "Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases.," *Angiogenesis*, vol. 6, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2003.

-
- [63] W. G. Stetler-Stevenson, "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, no. 9, pp. 1237–41, May 1999.
- [64] L. Claesson-Welsh, M. Welsh, N. Ito, B. Anand-Apte, S. Soker, B. Zetter, M. O'Reilly, and J. Folkman, "Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 10, pp. 5579–83, May 1998.
- [65] M. B. Goldring and S. R. Goldring, "Cytokines and cell growth control.," *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, vol. 1, no. 4, pp. 301–26, Jan. 1991.
- [66] M. Hoberg, G. Uzunmehmetoglu, L. Sabic, S. Reese, W. K. Aicher, and M. Rudert, "[Characterisation of human meniscus cells].," *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, vol. 144, no. 2, pp. 172–8.
- [67] A. Havemose-Poulsen and P. Holmstrup, "Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature.," *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 8, no. 2, pp. 217–36, Jan. 1997.
- [68] Verdonk R, Verdonk P, Huysse W, Forsyth R, Heinrichs EL, "Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions. " *Am J Sports Med* April 2011 vol. 39 no. 4 774-782.
- [69] M. E. Baratz, F. H. Fu, and R. Mengato, "Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report.," *The American journal of sports medicine*, vol. 14, no. 4, pp. 270–5.
- [70] A. B. Imhoff, R. Baumgartner, and R. D. Linke, "Checkliste Orthopädie," 2006, p. 397.
- [71] Dandy, D.J., The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions. *J Bone Joint Surg Br*, 1990. 72(4): p. 628-33.
-

-
- [72] J. H. Lee, T. Ort, K. Ma, K. Picha, J. Carton, P. A. Marsters, L. S. Lohmander, F. Baribaud, X.-Y. R. Song, and S. Blake, "Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro.," *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, vol. 17, no. 5, pp. 613–20, May 2009.
- [73] R. L. Mauck, G. J. Martinez-Diaz, X. Yuan, and R. S. Tuan, "Regional multilineage differentiation potential of meniscal fibrochondrocytes: implications for meniscus repair.," *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, vol. 290, no. 1, pp. 48–58, Jan. 2007.
- [74] K. P. Spindler, R. R. Miller, J. T. Andrish, and C. A. McDevitt, "Comparison of collagen synthesis in the peripheral and central region of the canine meniscus.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 303, pp. 256–63, Jun. 1994.
- [75] Sutton J. Ligaments: Their Nature and Morphology. London: MK Lewis, 1897.
- [76] S. P. Arnoczky, R. F. Warren, and J. M. Spivak, "Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 70, no. 8, pp. 1209–17, Sep. 1988.
- [77] F. W. Heatley, "The meniscus--can it be repaired? An experimental investigation in rabbits.," *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 62, no. 3, pp. 397–402, Aug. 1980.
- [78] D. King, "The healing of semilunar cartilages. 1936.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 252, pp. 4–7, Mar. 1990.
- [79] K. E. DeHaven and S. P. Arnoczky, "Meniscus repair: basic science, indications for repair, and open repair.," *Instructional course lectures*, vol. 43, pp. 65–76, Jan. 1994.
- [80] J. M. Kim and M. S. Moon, "Effect of synovectomy upon regeneration of meniscus in rabbits.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 141, pp. 287–94, Jun. 1979.
-

-
- [81] Y. Draenert and K. Draenert, "Gap healing of compact bone.," *Scanning electron microscopy*, no. 4, pp. 103–11, Jan. 1980.
- [82] S. P. Arnoczky, R. F. Warren, and N. Kaplan, "Meniscal remodeling following partial meniscectomy--an experimental study in the dog.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 1, no. 4, pp. 247–52, Jan. 1985.
- [83] J. M. Fox, K. G. Rintz, and R. D. Ferkel, "Trephination of incomplete meniscal tears.," *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 9, no. 4, pp. 451–5, Jan. 1993.
- [84] J. Klompmaker, H. W. Jansen, R. P. Veth, H. K. Nielsen, J. H. de Groot, and A. J. Pennings, "Porous polymer implants for repair of full-thickness defects of articular cartilage: an experimental study in rabbit and dog.," *Biomaterials*, vol. 13, no. 9, pp. 625–34, Jan. 1992.
- [85] J. Klompmaker, H. W. Jansen, R. P. Veth, H. K. Nielsen, J. H. de Groot, A. J. Pennings, and R. Kuijer, "Meniscal repair by fibrocartilage? An experimental study in the dog.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 10, no. 3, pp. 359–70, May 1992.
- [86] J. Klompmaker, R. P. Veth, H. W. Jansen, H. K. Nielsen, J. H. de Groot, A. J. Pennings, and R. Kuijer, "Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity.," *Biomaterials*, vol. 17, no. 17, pp. 1685–91, Sep. 1996.
- [87] L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R. J. Biron, D. B. Eagles, D. C. Lesnoy, S. K. Barlow, and R. Langer, "Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering.," *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, vol. 12, no. 7, pp. 689–93, Jul. 1994.
- [88] S. R. Frenkel and P. E. Di Cesare, "Scaffolds for articular cartilage repair.," *Annals of biomedical engineering*, vol. 32, no. 1, pp. 26–34, Jan. 2004.
-

-
- [89] S. B. Trippel, "Growth factor actions on articular cartilage.," *The Journal of rheumatology. Supplement*, vol. 43, pp. 129–32, Feb. 1995.
- [90] R. Mentlein and J. Held-Feindt, "Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy?," *Die Naturwissenschaften*, vol. 90, no. 9, pp. 385–94, Sep. 2003.
- [91] Y. M. Kim, J. W. Jang, O. H. Lee, J. Yeon, E. Y. Choi, K. W. Kim, S. T. Lee, and Y. G. Kwon, "Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase.," *Cancer research*, vol. 60, no. 19, pp. 5410–3, Oct. 2000.
- [92] F. Suzuki, "Roles of cartilage matrix proteins, chondromodulin-I and -II, in endochondral bone formation: a review.," *Connective tissue research*, vol. 35, no. 1–4, pp. 303–7, Jan. 1996.
- [93] H. P. Gerber, T. H. Vu, A. M. Ryan, J. Kowalski, Z. Werb, and N. Ferrara, "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.," *Nature medicine*, vol. 5, no. 6, pp. 623–8, Jun. 1999.
- [94] S. Liekens, E. De Clercq, and J. Neyts, "Angiogenesis: regulators and clinical applications.," *Biochemical pharmacology*, vol. 61, no. 3, pp. 253–70, Feb. 2001.
- [95] F. Villars, L. Bordenave, R. Bareille, and J. Amédée, "Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF?," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 79, no. 4, pp. 672–85, Sep. 2000.
- [96] J. Street, M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. D. Carano, and E. H. Filvaroff, "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 15, pp. 9656–61, Jul. 2002.
- [97] M. Clauss, H. Weich, G. Breier, U. Knies, W. Röckl, J. Waltenberger, and W. Risau, "The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and

- chemotaxis.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 30, pp. 17629–34, Jul. 1996.
- [98] T. Pufe, W. Petersen, B. Tillmann, and R. Mentlein, "Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis.," *The Journal of rheumatology*, vol. 28, no. 7, pp. 1482–5, Jul. 2001.
- [99] T. Pufe, W. Petersen, B. Tillmann, and R. Mentlein, "The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 44, no. 5, pp. 1082–8, May 2001.
- [100] T. Pufe, W. Petersen, B. Tillmann, and R. Mentlein, "The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons.," *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, vol. 439, no. 4, pp. 579–85, Oct. 2001.
- [101] Ehrenreich, T., *In vivo* Angiogeneseverhalten bei Tissue Engineering Produkten zur Reparatur von Meniskusklesionen am Rückenmarkmodell der Maus. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Universität Regensburg. 2013.
- [102] R. Becker, T. Pufe, S. Kulow, N. Giessmann, W. Neumann, R. Mentlein, and W. Petersen, "Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model.," *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 86, no. 7, pp. 1082–7, Sep. 2004.
- [103] M. K. Schuler and W. K. Aicher, "Interleukin-18 is regulated by G protein pathways and protein kinase signals in human fibroblasts.," *Rheumatology international*, vol. 24, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2004.
- [104] T. E. Maione, G. S. Gray, J. Petro, A. J. Hunt, A. L. Donner, S. I. Bauer, H. F. Carson, and R. J. Sharpe, "Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 247, no. 4938, pp. 77–9, Jan. 1990.

-
- [105] A. L. Angiolillo, C. Sgadari, D. D. Taub, F. Liao, J. M. Farber, S. Maheshwari, H. K. Kleinman, G. H. Reaman, and G. Tosato, “Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 182, no. 1, pp. 155–62, Jul. 1995.
- [106] D. J. Good, P. J. Polverini, F. Rastinejad, M. M. Le Beau, R. S. Lemons, W. A. Frazier, and N. P. Bouck, “A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6624–8, Sep. 1990.
- [107] N. Liu, R. K. Lapcevich, C. B. Underhill, Z. Han, F. Gao, G. Swartz, S. M. Plum, L. Zhang, and S. J. Green, “Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth.,” *Cancer research*, vol. 61, no. 3, pp. 1022–8, Feb. 2001.
- [108] M. A. Moses, D. Wiederschain, I. Wu, C. A. Fernandez, V. Ghazizadeh, W. S. Lane, E. Flynn, A. Sytkowski, T. Tao, and R. Langer, “Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 6, pp. 2645–50, Mar. 1999.
- [109] M. S. O’Reilly, L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage, and J. Folkman, “Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.,” *Cell*, vol. 79, no. 2, pp. 315–28, Oct. 1994.
- [110] M. S. O’Reilly, T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman, “Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.,” *Cell*, vol. 88, no. 2, pp. 277–85, Jan. 1997.
- [111] T. Pufe, W. J. Petersen, N. Miosge, M. B. Goldring, R. Mentlein, D. J. Varoga, and B. N. Tillmann, “Endostatin/collagen XVIII--an inhibitor of angiogenesis--is expressed in cartilage and fibrocartilage.,” *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, vol. 23, no. 5, pp. 267–76, Aug. 2004.
- [112] N. Yamaguchi, B. Anand-Apte, M. Lee, T. Sasaki, N. Fukai, R. Shapiro, I. Que, C. Lowik, R. Timpl, and B. R. Olsen, “Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell
-

- migration and tumor growth independently of zinc binding.," *The EMBO journal*, vol. 18, no. 16, pp. 4414–23, Aug. 1999.
- [113] K. Takahashi, Y. Saishin, Y. Saishin, R. L. Silva, Y. Oshima, S. Oshima, M. Melia, B. Paszkiet, D. Zerby, M. J. Kadan, G. Liao, M. Kaleko, S. Connelly, T. Luo, and P. A. Campochiaro, "Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 17, no. 8, pp. 896–8, May 2003.
- [114] W. Petersen, T. Pufe, C. Stärke, T. Fuchs, S. Kopf, M. Raschke, R. Becker, and B. Tillmann, "Locally applied angiogenic factors--a new therapeutic tool for meniscal repair.," *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, vol. 187, no. 5–6, pp. 509–19, Nov. 2005.
- [115] N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.," *Endocrine reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 581–611, Aug. 2004.
- [116] R. P. Veth, G. J. den Heeten, H. W. Jansen, and H. K. Nielsen, "Repair of the meniscus. An experimental investigation in rabbits.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 175, pp. 258–62, May 1983.
- [117] Caplan Al, Dennis JE., "Mesenchymal stem cells as trophic mediators. " *J Cell Biochem*, 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
- [118] Hofer HR, Tuan RS, "Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. " *Stem Cell Res Ther*. 2016 Sep 9;7(1):131. doi: 10.1186/s13287-016-0394-0.
- [119] D. J. Wood, R. J. Minns, and A. Strover, "Replacement of the rabbit medial meniscus with a polyester-carbon fibre bioprosthesis.," *Biomaterials*, vol. 11, no. 1, pp. 13–6, Jan. 1990.

- [120] J. Klompmaker, H. W. Jansen, R. P. Veth, J. H. de Groot, A. J. Nijenhuis, and A. J. Pennings, "Porous polymer implant for repair of meniscal lesions: a preliminary study in dogs.," *Biomaterials*, vol. 12, no. 9, pp. 810–6, Nov. 1991.
- [121] J. H. de Groot, R. de Vrijer, A. J. Pennings, J. Klompmaker, R. P. Veth, and H. W. Jansen, "Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses.," *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 163–73, Jan. 1996.
- [122] R. P. Veth, H. W. Jansen, J. W. Leenslag, A. J. Pennings, R. M. Hartel, and H. K. Nielsen, "Experimental meniscal lesions reconstructed with a carbon fiber-polyurethane-poly(L-lactide) graft.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 202, pp. 286–93, Jan. 1986.
- [123] J. Klompmaker, H. W. Jansen, R. P. Veth, H. K. Nielsen, J. H. de Groot, and A. J. Pennings, "Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage.," *Clinical materials*, vol. 14, no. 1, pp. 1–11, Jan. 1993.
- [124] J. L. Cook, D. B. Fox, P. Malaviya, J. L. Tomlinson, K. Kuroki, C. R. Cook, and S. Kladakis, "Long-term outcome for large meniscal defects treated with small intestinal submucosa in a dog model.," *The American journal of sports medicine*, vol. 34, no. 1, pp. 32–42, Jan. 2006.
- [125] J. L. Cook, J. L. Tomlinson, J. M. Kreeger, and C. R. Cook, "Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial.," *The American journal of sports medicine*, vol. 27, no. 5, pp. 658–65.
- [126] C. J. Walsh, D. Goodman, A. I. Caplan, and V. M. Goldberg, "Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model.," *Tissue engineering*, vol. 5, no. 4, pp. 327–37, Aug. 1999.
- [127] J. Bruns, J. Kahrs, J. Kampen, P. Behrens, and W. Plitz, "Autologous perichondral tissue for meniscal replacement.," *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 80, no. 5, pp. 918–23, Sep. 1998.

-
- [128] W. G. Rodkey, J. R. Steadman, and S. T. Li, "A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 367 Suppl, pp. S281–92, Oct. 1999.
- [129] K. R. Stone, W. G. Rodkey, R. Webber, L. McKinney, and J. R. Steadman, "Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically.," *The American journal of sports medicine*, vol. 20, no. 2, pp. 104–11.
- [130] E. Bell, "Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering.," *Tissue engineering*, vol. 1, no. 2, pp. 163–79, Jan. 1995.
- [131] K. R. Stone, W. G. Rodkey, R. J. Webber, L. McKinney, and J. R. Steadman, "Future directions. Collagen-based prostheses for meniscal regeneration.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 252, pp. 129–35, Mar. 1990.
- [132] R. J. Webber, J. L. York, J. L. Vanderschilden, and A. J. Hough, "An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus.," *The American journal of sports medicine*, vol. 17, no. 3, pp. 393–400.
- [133] K. R. Stone, "Meniscus replacement.," *Clinics in sports medicine*, vol. 15, no. 3, pp. 557–71, Jul. 1996.
- [134] P. B. van Wachem, M. J. van Luyn, P. Nieuwenhuis, H. K. Koerten, L. Olde Damink, H. Ten Hoopen, and J. Feijen, "In vivo degradation of processed dermal sheep collagen evaluated with transmission electron microscopy.," *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 215–23, Mar. 1991.
- [135] D. H. Gershuni, M. J. Skyhar, L. A. Danzig, J. Camp, A. R. Hargens, and W. H. Akeson, "Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 71, no. 9, pp. 1363–70, Oct. 1989.
- [136] J. Port, D. W. Jackson, T. Q. Lee, and T. M. Simon, "Meniscal repair supplemented with exogenous fibrin clot and autogenous cultured marrow cells in the goat model.," *The American journal of sports medicine*, vol. 24, no. 4, pp. 547–55.
-

- [137] C. E. Henning, M. A. Lynch, K. M. Yearout, S. W. Vequist, R. J. Stallbaumer, and K. A. Decker, "Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 252, pp. 64–72, Mar. 1990.
- [138] P. Angele, J. Abke, R. Kujat, H. Faltermeier, D. Schumann, M. Nerlich, B. Kinner, C. Englert, Z. Ruszczak, R. Mehrl, and R. Mueller, "Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices.," *Biomaterials*, vol. 25, no. 14, pp. 2831–41, Jun. 2004.
- [139] P. Angele, H. Faltermeier, R. Kujat, M. Maghsudi, H. D. Möller, and M. Nerlich, "[Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD].," *Langenbecks Archiv für Chirurgie. Supplement. Kongressband. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. Kongress*, vol. 115, no. Suppl I, pp. 205–8, Jan. 1998.
- [140] P. Angele, R. Kujat, M. Nerlich, J. Yoo, V. Goldberg, and B. Johnstone, "Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge.," *Tissue engineering*, vol. 5, no. 6, pp. 545–54, Dec. 1999.
- [141] P. Angele, D. Schumann, M. Angele, B. Kinner, C. Englert, R. Hente, B. Füchtmeier, M. Nerlich, C. Neumann, and R. Kujat, "Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.," *Biorheology*, vol. 41, no. 3–4, pp. 335–46, Jan. 2004.
- [142] P. Angele, J. U. Yoo, C. Smith, J. Mansour, K. J. Jepsen, M. Nerlich, and B. Johnstone, "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro.," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 21, no. 3, pp. 451–7, May 2003.
- [143] D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, and D. F. Williams, "Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification.," *Biomaterials*, vol. 19, no. 23, pp. 2101–27, Dec. 1998.
- [144] M. Koide, K. Osaki, J. Konishi, K. Oyamada, T. Katakura, A. Takahashi, and K. Yoshizato, "A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-

- linked composites of fibrillar and denatured collagens.," *Journal of biomedical materials research*, vol. 27, no. 1, pp. 79–87, Jan. 1993.
- [145] G. Abatangelo, R. Cortivo, M. Martelli, and P. Vecchia, "Cell detachment mediated by hyaluronic acid.," *Experimental cell research*, vol. 137, no. 1, pp. 73–8, Jan. 1982.
- [146] R. Cortivo, A. De Galateo, I. Castellani, P. Brun, M. G. Giro, and G. Abatangelo, "Hyaluronic acid promotes chick embryo fibroblast and chondroblast expression.," *Cell biology international reports*, vol. 14, no. 2, pp. 111–22, Feb. 1990.
- [147] B. A. Mast, R. F. Diegelmann, T. M. Krummel, and I. K. Cohen, "Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts.," *Matrix (Stuttgart, Germany)*, vol. 13, no. 6, pp. 441–6, Nov. 1993.
- [148] M. Radice, P. Brun, R. Cortivo, R. Scapinelli, C. Battaliard, and G. Abatangelo, "Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors.," *Journal of biomedical materials research*, vol. 50, no. 2, pp. 101–9, May 2000.
- [149] P. Rooney and S. Kumar, "Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis.," *Differentiation; research in biological diversity*, vol. 54, no. 1, pp. 1–9, Aug. 1993.
- [150] S. C. Wheatley, C. M. Isacke, and P. H. Crossley, "Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning.," *Development (Cambridge, England)*, vol. 119, no. 2, pp. 295–306, Oct. 1993.
- [151] S. Takashiba, K. Naruishi, and Y. Murayama, "Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology.," *Journal of periodontology*, vol. 74, no. 1, pp. 103–10, Jan. 2003.
- [152] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and J. U. Yoo, "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.," *Experimental cell research*, vol. 238, no. 1, pp. 265–72, Jan. 1998.

-
- [153] J. U. Yoo, T. S. Barthel, K. Nishimura, L. Solchaga, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and B. Johnstone, "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 80, no. 12, pp. 1745–57, Dec. 1998.
- [154] L. A. Solchaga, J. E. Dennis, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan, "Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 17, no. 2, pp. 205–13, Mar. 1999.
- [155] L. A. Fortier, C. E. Balkman, L. J. Sandell, A. Ratcliffe, and A. J. Nixon, "Insulin-like growth factor-I gene expression patterns during spontaneous repair of acute articular cartilage injury.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 19, no. 4, pp. 720–8, Jul. 2001.
- [156] J. Bujía, P. Pitzke, E. Kastenbauer, E. Wilmes, and C. Hammer, "Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal chondrocytes cultured in monolayer and in agar.," *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, vol. 253, no. 6, pp. 336–40, Jan. 1996.
- [157] J. K. Fernihough, M. E. Billingham, S. Cwyfan-Hughes, and J. M. Holly, "Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 39, no. 9, pp. 1556–65, Sep. 1996.
- [158] J. L. van Susante, P. Buma, H. M. van Beuningen, W. B. van den Berg, and R. P. Veth, "Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 18, no. 1, pp. 68–77, Jan. 2000.
- [159] T. I. Morales, "Transforming growth factor-beta 1 stimulates synthesis of proteoglycan aggregates in calf articular cartilage organ cultures.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 286, no. 1, pp. 99–106, Apr. 1991.
-

-
- [160] A. J. Nixon, J. T. Lillich, N. Burton-Wurster, G. Lust, and H. O. Mohammed, "Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 16, no. 5, pp. 531–41, Sep. 1998.
- [161] R. Okazaki, A. Sakai, Y. Uezono, A. Ootsuyama, N. Kunugita, T. Nakamura, and T. Norimura, "Sequential changes in transforming growth factor (TGF)-beta1 concentration in synovial fluid and mRNA expression of TGF-beta1 receptors in chondrocytes after immobilization of rabbit knees.," *Journal of bone and mineral metabolism*, vol. 19, no. 4, pp. 228–35, Jan. 2001.
- [162] R. Cancedda, F. Descalzi Cancedda, and P. Castagnola, "Chondrocyte differentiation.," *International review of cytology*, vol. 159, pp. 265–358, Jan. 1995.
- [163] C. Jorgensen, D. Noel, F. Apparailly, and J. Sany, "Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.," *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 60, no. 4, pp. 305–9, Apr. 2001.
- [164] R. T. Ballock, A. Heydemann, L. M. Wakefield, K. C. Flanders, A. B. Roberts, and M. B. Sporn, "TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases.," *Developmental biology*, vol. 158, no. 2, pp. 414–29, Aug. 1993.
- [165] T. Tanaka, K. Fujii, and Y. Kumagae, "Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus.," *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*, vol. 7, no. 2, pp. 75–80, Jan. 1999.
- [166] S. Collier and P. Ghosh, "Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus.," *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, vol. 3, no. 2, pp. 127–38, Jun. 1995.
- [167] J. Zellner, M. Mueller, A. Berner, T. Dienstknecht, R. Kujat, M. Nerlich, B. Hennemann, M. Koller, L. Prantl, M. Angele, and P. Angele, "Role of mesenchymal

-
- stem cells in tissue engineering of meniscus.,” *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1150–61, Sep. 2010.
- [168] P. Angele, B. Johnstone, R. Kujat, J. Zellner, M. Nerlich, V. Goldberg, and J. Yoo, “Stem cell based tissue engineering for meniscus repair.,” *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 85, no. 2, pp. 445–55, May 2008.
- [169] B. K. Zebrowski, S. Yano, W. Liu, R. M. Shaheen, D. J. Hicklin, J. B. Putnam, and L. M. Ellis, “Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions.,” *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 5, no. 11, pp. 3364–8, Nov. 1999.
- [170] B. K. Zebrowski, W. Liu, K. Ramirez, Y. Akagi, G. B. Mills, and L. M. Ellis, “Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites.,” *Annals of surgical oncology*, vol. 6, no. 4, pp. 373–8, Jun. 1999.
- [171] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, “Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.,” *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 13, no. 1, pp. 9–22, Jan. 1999.
- [172] J. G. Hofstaetter, F. A. Saad, R. E. Samuel, L. Wunderlich, Y.-H. Choi, and M. J. Glimcher, “Differential expression of VEGF isoforms and receptors in knee joint menisci under systemic hypoxia.,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 324, no. 2, pp. 667–72, Nov. 2004.
- [173] N. Hansen-Algenstaedt, P. Algenstaedt, A. Böttcher, C. Joscheck, B. Schwarzloh, C. Schaefer, I. Müller, C. Koike, W. Rütter, and B. Fink, “Bilaterally increased VEGF-levels in muscles during experimental unilateral callus distraction.,” *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 21, no. 5, pp. 805–12, Sep. 2003.
- [174] T. Pufe, V. Harde, W. Petersen, M. B. Goldring, B. Tillmann, and R. Mentlein, “Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes.,” *The Journal of pathology*, vol. 202, no. 3, pp. 367–74, Mar. 2004.
-

- [175] P. G. Mitchell, H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan, and J. E. Hambor, "Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 97, no. 3, pp. 761–8, Feb. 1996.
- [176] C. Jacques, M. Gosset, F. Berenbaum, and C. Gabay, "The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation.," *Vitamins and hormones*, vol. 74, no. null, pp. 371–403, Jan. 2006.
- [177] P. Goupille, M. I. Jayson, J. P. Valat, and A. J. Freemont, "Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration?," *Spine*, vol. 23, no. 14, pp. 1612–26, Jul. 1998.
- [178] Forriol F, Longo UG, Duart J, Ripalda P, Vaquero J, Loppini M, Romeo G, Campi S, Khan WS, Muda AO, Denaro V, "VEGF, BMP-7, Matrigel(TM), hyaluronic acid, in vitro cultured chondrocytes and trephination for healing of the avascular portion of the meniscus. An experimental study in sheep." *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;10(1):69-76.

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

13.09.1984	Als erstes Kind von Petra Flühr, geb.Rothmeier und Dr. med. Wolfram Flühr in Sinsheim geboren
1991-1995	Besuch der Grundschule Hilsbach-Weiler
1995-2004	Besuch des Wilhelmi-Gymnasiums Sinsheim
2005-2012	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07-12/2012	Assistenzarzt in der chirurgisch/orthopädisch und unfallchirurgischen Praxis Dr. Schindler und Kollegen, Eberbach
Ab 1.1.2013-heute	Assistenzarzt für Urologie in der Paracelsus Klinik Düsseldorf-Golzheim

7.2 Danksagung

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Januar 2009 bis Oktober 2010 an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie an den Forschungslaboratorien des Universitätsklinikums Regensburg erstellt.

Herrn Prof. Dr. med. M. Nerlich möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas und die kontinuierliche Unterstützung während des Fortgangs meiner Arbeit danken. Auch für die Möglichkeit zur Teilnahme an Forschungswochenenden und Weiterbildungen möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Ganz besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. P. Angele, der mich durch sein Interesse an meiner Arbeit und seiner hilfreichen Erfahrung auf dem Gebiet des Tissue Engineering unterstützt hat.

Herr Dr. med. J. Zellner hat mich während meiner gesamten Arbeit hervorragend betreut. Seine wertvollen Ratschläge und seine Unterstützung bei allen auftretenden Fragen ermöglichten ein Voranschreiten der Arbeit ohne Zeitverlust. Außerdem machte sein Mitwirken mit Ideen und Verbesserungsvorschlägen ein Gelingen der Arbeit erst möglich. Hierfür meinen ganz besonderen Dank.

Bei Herrn Dr. R. Kujat bedanke ich mich sehr für die Anleitung in wissenschaftlichem Arbeiten und für seine geduldige Hilfe.

Nicht zuletzt geht mein Dank an alle Mitarbeiter der Unfallchirurgie der Universitätsklinik Regensburg. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau D. Drenkard bedanken, die mich während der gesamten Zeit meiner Labortätigkeit bei allen Problemen unterstützte und dies auch außerhalb ihrer Dienstzeit.