

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker

**Ansiedlungsversuche von humanen Fibrochondrozyten
auf biokompatiblen, dreidimensionalen
Trägermaterialien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sebastian Reese
aus
Stuttgart

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Rudert

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Skutella

**gewidmet
meinen Eltern
und Yvonne**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Meniskus – Anatomie und Funktion	1
1.1.1	Makroskopische Anatomie	1
1.1.2	Histologie	3
1.1.3	Physiologie und Biomechanik	5
1.2	Meniskusverletzungen	5
1.3	Ziel der Studie	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Labortechnische Apparate und Instrumente	9
2.1.2	Chemikalien	11
2.1.3	Scaffold-Fabrikate	15
2.1.4	Humanes Operationsmaterial	16
2.2	Methoden	18
2.2.1	Studienaufbau	18
2.2.2	Zellkultur	19
2.2.3	Zellernte	21
2.2.4	Zellzahlbestimmung	22
2.2.5	Besiedelung der Trägermaterialien	22
2.2.6	Immunhistochemische Färbungen	25
2.2.7	RT-PCR	29
2.2.8	Herstellung von Paraffinschnittpräparaten	35
2.2.9	Histologische Standardfärbungen	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Zellkultur	39
3.1.1	Zellzahl	39
3.1.2	RNA-Quantifizierung	40

3.2	Zellcharakterisierung.....	41
3.2.1	RT-PCR	41
3.2.2	Immunhistochemie an der in-vitro Zellkultur	45
3.3	Besiedlung der Trägermaterialien	49
3.3.1	Besiedlungserfolg/HE-Färbung.....	49
3.3.2	Alzianblau-Färbung.....	54
3.3.3	Immunhistochemie am Paraffinschnitt	56
4	Diskussion	62
4.1	Zellkultur	62
4.1.1	Zellzahl	62
4.1.2	RNA-Quantifizierung.....	63
4.2	Zellcharakterisierung.....	63
4.2.1	RT-PCR	63
4.2.2	Immunhistochemie an der in-vitro Zellkultur	65
4.3	Besiedlung der Trägermaterialien	67
4.3.1	Einbettung in Paraffin.....	67
4.3.2	Besiedlungserfolg/HE-Färbung.....	68
4.3.3	Alzianblaufärbung am Paraffinschnitt.....	70
4.3.4	Immunhistochemie am Paraffinschnitt	71
4.4	Conclusio	73
5	Zusammenfassung.....	76
6	Literaturverzeichnis	79
7	Danksagung.....	82
8	Curriculum vitae	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Meniskus (aus: Sobotta interaktiv: Bewegungsapparat. Urban und Fischer, 2000).....	2
Abbildung 2: Blutversorgung des Meniskus (aus: Sobotta interaktiv: Bewegungsapparat. Urban und Fischer, 2000).....	3
Abbildung 3: Meniskushistologie (aus: Sobotta interaktiv: Bewegungsapparat. Urban und Fischer, 2000).....	4
Abbildung 4: Meniskusriss – Lokalisationen.....	6
Abbildung 5: Flussdiagramm Studienaufbau.....	18
Abbildung 6: Besiedlungsschema.....	24
Abbildung 7: Prinzip der Immunhistochemie.....	25
Abbildung 8: Prinzip der DNA-Amplifikation (nach Löffler-Petrides: Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag 1998).....	30
Abbildung 9: Schema Gelelektrophorese.....	31
Abbildung 10: PCR-Ergebnis Koll. I, II.....	43
Abbildung 11: PCR-Ergebnis MMP1, 2, 3, 8.....	43
Abbildung 12: PCR-Ergebnis IL-1, -6, -18.....	44
Abbildung 13: PCR-Ergebnis TGF β , BMP2, iNOS.....	45
Abbildung 14: Koll. I (li.), Koll. II (re.).....	46
Abbildung 15: Koll. III (li.), Koll. VI (re.).....	46
Abbildung 16: MMP1 (li.), MMP3 (re.).....	46
Abbildung 17: MMP8 (li.), AS02 (re.).....	47
Abbildung 18: Neg. Kontrolle Anti-Maus.....	47
Abbildung 19: iNOS (li.), IL1-RA (re.).....	48
Abbildung 20: Neg. Kontrolle Anti-Kaninchen.....	48
Abbildung 21: PLLA Tag 15, Zellhaufen am Polymerrand (li.), einzelne Faser mit Zellhaufen (re.).....	50
Abbildung 22: LG9010 Tag 15, Zellhaufen am Polymerrand (li., 10 x Objektiv), Polymerzentrum (re., 25 x Objektiv).....	50
Abbildung 23: HE-Färbung: CMI (li.) am Tag 30 ohne erkennbare Zellen; Pelvicol-Pore (re.) am Tag 15.....	53

Abbildung 24: HE-Färbung: Pelvicol am Tag 15 (li.) und am Tag 30 (re.) mit Zunahme der Zelldichte.....	53
Abbildung 25: HE-Färbung: LG9010 am Tag 15	54
Abbildung 26: Alzianblau-Färbung (Paraffinschnitt): LG9010-Faser mit rot angefärbten Kernen (li.), hier ohne erkennbare Blaufärbung; Pelvicol (re.) mit deutlicher Blaufärbung.....	56
Abbildung 27: Alzianblaufärbung Knorpel, Blaufärbung im Bereich der Territorien.....	56
Abbildung 28: Pelvicol-Vlies ohne Zellen nach immunhistochemischer Färbung mit Koll. I Antikörper	59
Abbildung 29: Koll. I: LG9010 (Tag 30, li.) negativ, Pelvicol-Pore (Tag 30, re.) positiv, Knorpel (unten) im knöchernen Bereich positiv.....	59
Abbildung 30: Koll. II: LG9010 (Tag 15, li.) und Pelvicol (Tag 15, re.), jeweils negativ; Knorpel (unten) in der Matrix deutlich positiv	60
Abbildung 31: Koll. VI: PLLA (Tag 15, li.) und Pelvicol (Tag 15, re.) jeweils positiv	60
Abbildung 32: MMP1: PLLA (Tag 30, li.) positiv, Pelvicol (Tag 30, re.) positiv .	61
Abbildung 33: Spinnerflask, nach Vunjak et al. 1998	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientendaten	17
Tabelle 2: Protokoll Einbettautomat.....	35
Tabelle 3: Übersicht Ergebnisse Zellzahl	39
Tabelle 4: Übersicht Ergebnisse RNA-Quantifizierung.....	40
Tabelle 5: PCR-Protokoll.....	41
Tabelle 6: Übersicht Ergebnisse Immunhistochemie.....	49
Tabelle 7: Übersicht Ergebnisse HE-Färbung	51
Tabelle 8: Übersicht Ergebnisse Alzianblau-Färbung.....	54
Tabelle 9: Übersicht Ergebnisse Immunhistochemie.....	57

Abkürzungen

µl:	Mikroliter
A.:	Arteria
AEC:	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BMP:	Bone-morphologic-protein
BSA:	bovines Serumalbumin
cDNA:	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMI:	Collagen meniscal implant
CO ₂ :	Kohlendioxid
DMEM:	Dulbecco´s modified Eagle medium
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS:	Dulbecco´s Phosphat-gepufferte Saline
E:	Extinktion
EDTA:	Äthylendiamintetraessigsäure
FCS:	fetales Kälberserum
g:	Gramm
GAPDH:	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GMA:	Glykolmetakrylat
h:	Stunde
H ₂ O:	Wasser
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HE:	Hämatoxylin/Eosin
IL:	Interleukin
IL1RA:	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
iNOS:	Induzierbare Stickoxid-Synthetase
ITS:	Insulin-Transferrin-Selenium
ITV	Institut für Textilverarbeitung
Koll.:	Kollagen
KTP:	Knietotalprothese

Lig.:	Ligamentum
M:	Meniskus-Patient
MgCl ₂ :	Magnesiumchlorid
min:	Minute
ml:	Milliliter
MMP:	Matrix-Metalloproteinase
mV:	Millivolt
nm:	Nanometer
PBS:	Phosphat-gepufferte Saline
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
pH:	Potentia hydrogenii
PLGA:	Poly L-lactid-glycolid-acid
PLLA:	Poly-L-lactid-acid
RNA:	Ribonukleinsäure
s:	Sekunde
TBE:	Tris-Borsäure EDTA Lsg.
TGF:	Tumor-growth-factor
U:	Unit
UV:	Ultraviolett

1 Einleitung

Das Kniegelenk gehört zu den am meisten belasteten Gelenken des menschlichen Körpers. Somit sind Verletzungen und degenerative Erkrankungen des Kniegelenkes keine Seltenheit. Insbesondere bei Risikosportarten wie Fußball oder Skifahren kann es zu Verletzungen der Seitenbänder und Kreuzbänder kommen; dabei wird auch der Meniskus, bedingt durch seine Lage und Funktionsweise, nicht immer von Schäden verschont.

1.1 Der Meniskus – Anatomie und Funktion

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Der Meniskus des menschlichen Kniegelenkes ist ein im Transversalschnitt halbmondförmiger, im Frontalschnitt keilförmiger Faserknorpel, der sich jeweils paarig im Gelenkspalt zwischen Femurkondylen und Tibiaplateau befindet. Im Operationspräparat ist der Meniskus ein elastisches, weiß glänzendes Gewebe, das an der Außenseite von einer synovialen Membran überzogen ist.

Der mediale Meniskus ist etwas größer und durch die Verwachsung mit dem tibialen Kollateralband und seine formbedingte, stabilere Fixierung mit dem Tibiaplateau nur beschränkt beweglich. Der fast o-förmige und kleinere laterale Meniskus ist etwas freier auf der Gelenkfläche verschieblich, da er nicht mit dem fibularen Kollateralband verwachsen ist.

Beide Menisci sind am vorderen Horn durch das Ligamentum transversum genus quer miteinander verbunden, sowie jeweils durch die sogenannten Ligamenta meniscotibialia mit dem Tibiaplateau verwachsen.

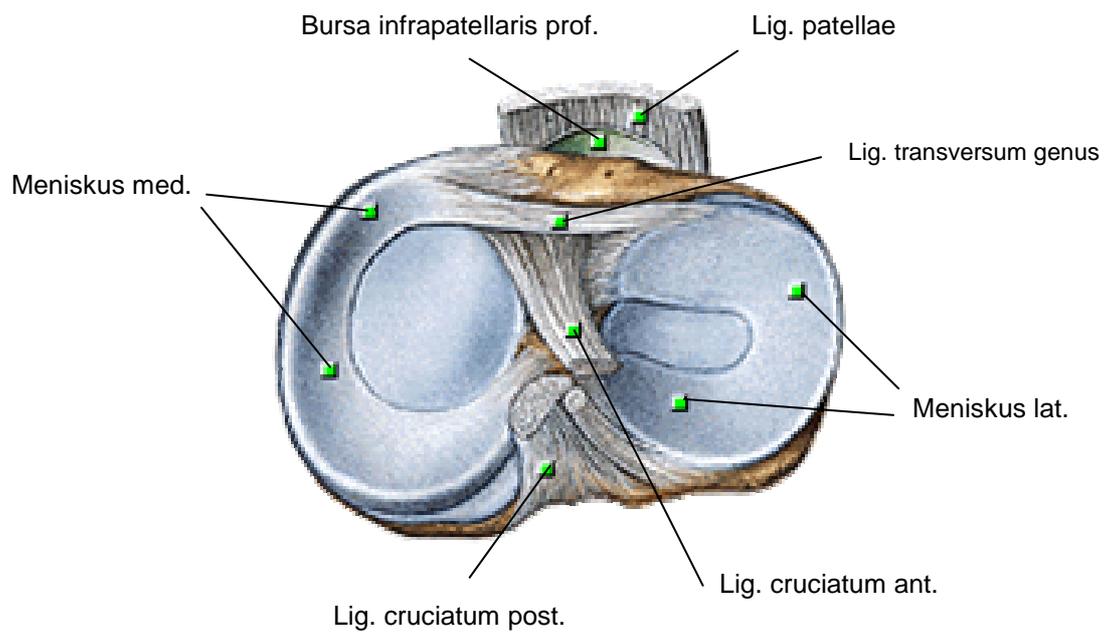


Abbildung 1: Anatomie des Meniskus (aus: Sobotta interaktiv: Bewegungsapparat. Urban und Fischer, 2000)

Die Menisci werden durch einen arteriellen Ring mit Blut versorgt. Dieser arterielle Ring entspringt aus der Arteria poplitea und besteht aus der A. inferior medialis bzw. lateralis genus. Der arterielle Ring ist im Tibiaplateau-Zentrum verbunden mit dem Ramus anterior bzw. posterior der A. media genus, die ihrerseits wiederum aus der A. poplitea entspringt.

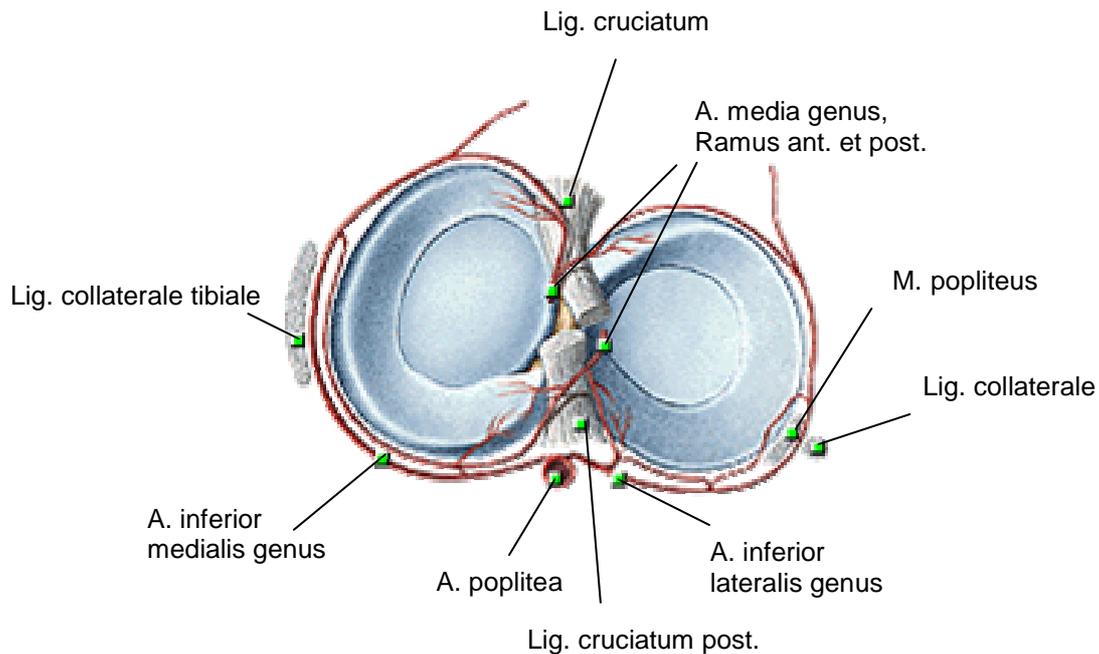


Abbildung 2: Blutversorgung des Meniskus (aus: Sobotta interaktiv: Bewegungsapparat. Urban und Fischer, 2000)

Diese Blutversorgung erreicht bei einem erwachsenen Menschen jedoch nur die äußeren Anteile des Meniskus, die inneren sind nicht vaskularisiert. Lediglich im Kindesalter ist der Meniskus vollständig von Gefäßen durchzogen. Die höchste Innervationsdichte herrscht in den Hörnern der Menisci. Analog zur Blutversorgung findet man größere ringförmig verlaufende Nerven sowie kleine, radial verlaufende Nerven, die sich jedoch ebenfalls auf das äußere Drittel beschränken^{2, 15}.

1.1.2 Histologie

Der humane Meniskus besteht zu einem großen Teil aus sogenanntem Faserknorpel¹.

In der Literatur wird meist von zwei unterschiedlichen Zellsubtypen gesprochen: die oberflächliche Zone wird von einem eher oval bis länglichen, Fibroblasten-

Einleitung

ähnlichen Zelltyp mit großen Kernen beherrscht, in den tieferen Zonen findet man vor allem rundere und polygonale Zellen. Diese erinnern an die typischen Chondrozyten, was Morphologie und umgebendes Territorium samt hoher Konzentration an perizellulären Proteoglykanen angeht. Allerdings produzieren diese Zellen im Gegensatz zu dem von Chondrozyten synthetisiertem Kollagen II vornehmlich Kollagen I. Daher werden die Zellen von vielen Autoren als Fibrochondrozyten bezeichnet^{2, 14, 15}.

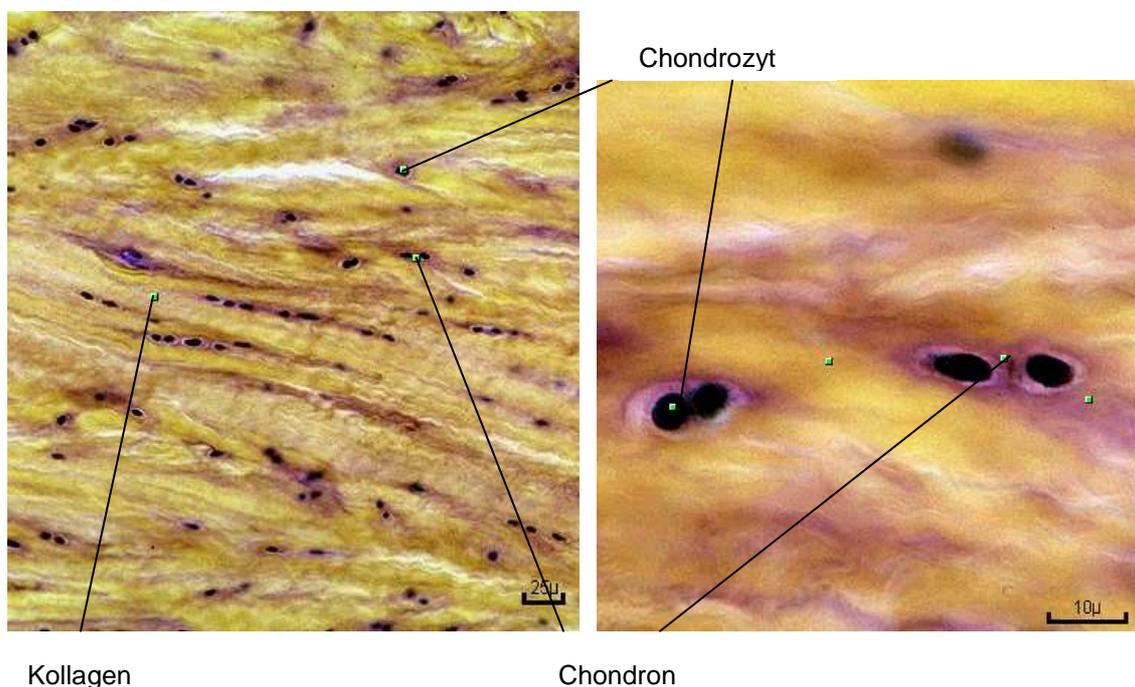


Abbildung 3: Meniskushistologie (aus: Sobotta interaktiv: Bewegungsapparat. Urban und Fischer, 2000)

Die kollagenen Anteile (Typ I, II, III, V und VI) des Meniskus machen 60 – 70 % des Trockengewichts aus³, wobei Kollagen I deutlich dominiert. Die Kollagenfasern sind in den tieferen Anteilen des Meniskus zirkulär, in den oberflächlicheren fischgrätenartig angeordnet. An Proteoglykanen findet man

Chondroitin-4-Sulfat (40%), Chondroitin-6-Sulfat(10-20%), Dermatan Sulfat (20-30%) sowie Keratan Sulfat (15%). Schließlich wurden von Miller et al. drei verschiedene sogenannte Adhäsionsglykoproteine benannt, zu denen Kollagen Typ VI, Fibronectin und Thrombospondin zählen. Ihre Aufgabe ist, die Bindung mit anderen Molekülen und Zellen zu gewährleisten und damit für einen stabilen Zellverbund zu sorgen^{4, 15}.

1.1.3 Physiologie und Biomechanik

Wären die Gelenkflächen der Tibia der Krümmung der Femurkondylen angepasst, so wäre die Beuge-Streck-Bewegung im Kniegelenk sicherlich ausreichend gesichert. Die Rotation im Kniegelenk wäre dadurch aber nicht möglich. Daher dienen die Menisci als bewegliche Gelenkpfannen, die sich sowohl bei Flexion-Extension als auch bei Rotation mitbewegen: bei der Flexion werden die Menisci durch die Femurkondylen nach dorsal gedrängt, bei Extension nach ventral. Bei Außenrotation bewegt sich der laterale Meniskus nach vorne, bei Innenrotation der mediale⁵.

Die Menisci verleihen dadurch dem Kniegelenk eine gewisse Bewegungsstabilität und wirken nebenbei auch noch als Stoßdämpfer⁶. Dies macht verständlich, dass die Menisci einer großen mechanischen Beanspruchung unterliegen und es bei entsprechender Überbeanspruchung nicht selten zu Verletzungen kommen kann.

1.2 Meniskusverletzungen

Laut einer Studie des National Center for Health Statistics (USA) sind jährlich 600 000 Operationen Folge von Meniskusschäden¹⁵.

Meniskusschäden können einerseits degenerative Ursachen haben, wie z.B. die Gonarthrose, wobei hier Ursache und Folge individuell austauschbar sind. Andererseits sind auch Traumata verantwortlich für Meniskusverletzungen. Hierbei ist vor allem der mediale Meniskus betroffen, da er aufgrund seiner

stabileren Fixierung (s. 1.1.1) nicht so beweglich ist und damit die Gefahr der Einklemmung zwischen Femur und Tibia umso größer ist. Beispielhaft kann hier das Strecktrauma genannt werden, bei dem der Meniskus im Falle einer schnellen Streckung im Kniegelenk nicht schnell genug folgen kann und eingeklemmt wird⁵.

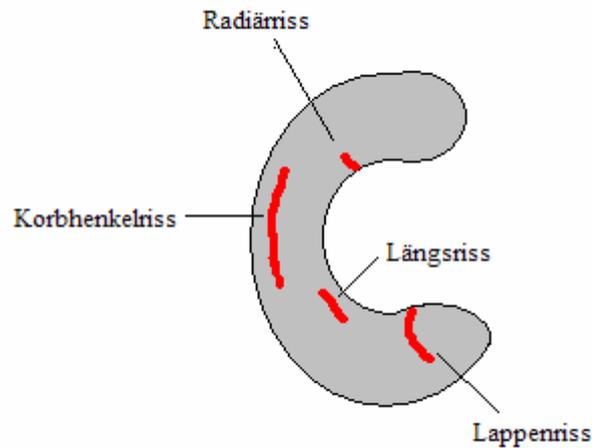


Abbildung 4: Meniskusriss – Lokalisationen

Eine endogene Heilung des Meniskus im Falle von Verletzungen ist grundsätzlich möglich. Da dies aber zwingend von ausreichender Gefäßversorgung abhängig ist, beschränkt sich diese Fähigkeit allein auf die äußeren, vaskularisierten Bereiche des Meniskus.

Für die Therapie von Meniskusschäden bieten sich daher verschiedene Optionen an, wie beispielsweise die Naht von Rissen oder Teil- bzw. Totalresektionen. Insbesondere nach Resektionen zeigt sich aber, dass das Risiko an einer Gonarthrose zu erkranken, steigt.

1.3 Ziel der Studie

Alternativen zu obengenannten Methoden liegen einerseits in der Implantation von künstlichen Meniskusersatzmaterialien, wie beispielsweise dem Collagen meniscal implant (CMI), einem aus Kollagen bestehenden Meniskusersatzimplantat.

Andererseits verbreitet sich in multiplen Organsystemen die Technik des partiellen oder sogar totalen Organersatzes durch körpereigene Zellen, das sogenannte Tissue engineering. Diese werden isoliert, unter sterilen Bedingungen in Kultur genommen und auf verschiedene Art und Weise wieder in den Körper eingebracht werden, entweder in Form einer Suspension oder auf unterschiedlichen Trägermaterialien.

Erste Meniskuszellkulturen gelangen Webber et al., es handelte sich um Menisci von Hasen. Er stellte fest, dass im Unterschied zu diesen Fibrochondrozyten humane Fibrochondrozyten langsamer proliferieren und ein sternförmigeres Erscheinungsbild haben⁷. Der Gebrauch von Polymer- oder Kollagen-Trägermaterialien als Gerüst für die Zellen ermöglicht schließlich, ganze Organteile heranzuzüchten, wie z.B. auch Herzklappen⁸. Als Richtlinie für Trägermaterialien im Tissue engineering mit Fibrochondrozyten in der klinischen Anwendung stellten Stone et al. folgende Vorgaben auf:

- das Implantat muss lange genug überdauern
- es darf keine Fremdkörper-Reaktion auftreten
- es sollte ausreichend stabil sein
- es sollte das Voranschreiten von degenerativer Arthritis verhindern⁹

So ist das Fernziel dieses Projektes, Tissue engineering mit Meniskuszellen zu ermöglichen und damit in Zukunft Meniskusschäden mit körpereigenen Zellen beheben bzw. sogar einen körpereigenen totalen Meniskusersatz implantieren zu können.

Dies ist, wie erwähnt, nur in Verbindung der Zellen mit bestimmten Trägermaterialien möglich. Die Trägermaterialien bieten den Zellen dabei eine

Oberfläche, um anwachsen zu können und ersetzen anfangs die Interzellulärsubstanz, solange diese noch nicht in ausreichendem Maße von den Zellen selbst produziert wird. Dabei bietet sich auch die Möglichkeit an, mit biodegradierbaren Materialien zu arbeiten, die unter den physiologischen Gegebenheiten des Körpers abgebaut werden. Nachteile können hier aber durch Entzündungsreaktionen entstehen, die durch Abbauprodukte hervorgerufen werden¹⁰.

Als Ziel dieser Studie war somit zu prüfen, ob Meniskuszellen aus einer Primärkultur für die Übersiedlung auf unterschiedliche Trägermaterialien, sogenannte Scaffolds, geeignet sind und welche Technik sich für die Übersiedlung empfiehlt. Des Weiteren wurde die Auswahl der verwendeten Trägermaterialien auf ihre Tauglichkeit für das Tissue engineering mit Meniskuszellen hin überprüft. Dabei musste auch besonderes Augenmerk auf etwaige Dedifferenzierung der Zellen im Verlauf der Kulturzeit gelegt werden, da dies bereits von mehreren Autoren beobachtet worden war (vgl. Schnabel et al. 2002)¹¹

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labortechnische Apparate und Instrumente

Absaugpumpe

Suc-O-Mat; Bachofer, Reutlingen/D

Brutschrank

CO₂ Auto Zero Inkubator, Heraeus, Hanau/D

Deckgläser

24x32mm; Langenbrinck, Emmendingen/D

Einbettkapsel

Paraffin Cassette Tissue Tek III; Miles limited, Slough/GB

Einmalskalpelle

Cutifix; Braun Medical AG, Melsungen/CH

Eppendorf-Cups

0,5ml; Eppendorf, Hamburg/D

Feinwaage

Mettler P1210; Mettler Toledo, Giessen/D

Gelkammer

DNA Pocket-Block UV; Biozym, Hess. Oldendorf/D

Gewebeeinbettssystem

Tissue Tek III; Miles limited, Slough/GB

Hypercenter XP Einbettautomat; Thermo Electron Corporation/USA

Gewebekulturplatte 24-Well

Greiner GmbH, Nürtingen/D

Gewebekulturplatte 6-Well

Greiner GmbH, Nürtingen/D

Material und Methoden

Kulturflaschen

Tissue Culture Flask 250ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA

Lichtmikroskop

Fluovert FS Mikroskop; Leitz, Wetzlar/D

Magnetrührer

Ikamag RCT; Ika-Labortechnik, Staufen i.Br./D

Mikrotom

Schlittenmikrotom HN40; Jung, Heidelberg/D

Mixer

Super-Mixer; Lab-Line Instruments, Inc., USA

Objektträger

Super Frost plus, 25x75x1,0mm; Langenbrinck, Emmendingen/D

PCR-Block

Thermocycler UNO II; Biometra, Göttingen/D

Petrischalen

Cellstar, 94/16mm, steril; Greiner, Nürtingen/D

Photoapparat

Vario-Orthomat; Leitz, Wetzlar/D

Pinzetten

Aesculap, Tuttlingen/D

Pipetten

EpT.I.P.S.; Eppendorf, Hamburg/D

Serological Pipet, 1, 2, 5, 10, 25ml; Becton Dickinson, Fr. Lakes/USA

Combitips Biopur; Eppendorf, Hamburg/D

Pipettierhilfen

Pipetman 10/20/100/200µl; Gilson, Middleton/USA

Accujet; Brand GmbH, Wertheim/D

Power Pack P25 (Gelelektrophorese)

Biometra; Göttingen/D

Scheren

Aesculap, Tuttlingen/D

Spectrophotometer

Jasco V530; Jasco, Groß Umstadt/D

Sterilarbeitsbank

Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl/D

Sterilfilter

Millex GV 0,22µm; Millipore, Molsheim/F

Test-Röhrchen

PP Test tubes 50ml; Greiner, Nürtingen/D

Urinbecher

Wasserbad

Memmert GmbH, Schwabach/D

Daglef Patz, Wankendorf/D

Zentrifuge

Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg/D

Zentrifuge 5412; Eppendorf, Hamburg/D

2.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Agarose

SeaKem LE agarose; Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland/USA

Alzianblau

Alzianblau 8GX; Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Ampuwa-Wasser

Borsäure

Merck, Darmstadt/D

Bovines Serumalbumin

Albumine, bovine, Fraction V; Sigma Aldrich, St. Louis/USA

cDNA-Synthese-Kit

Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto/USA

Material und Methoden

Collagenase Typ XI

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Desinfektionslösung

Antifect Liquid; Schülke & Mayr, Norderstedt/D

DNA-Eichmarker

100bp DNA-Ladder; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Eindeckmittel

Aquatex; Merck, Darmstadt/D

DePeX; Serva, Heidelberg/D

Eosin

Eosin G; Merck, Darmstadt/D

Ethanol

Ethanol p.a., absolut; Merck, Darmstadt/D

Ethidiumbromid

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Färbekit / Immunhistochemie

AEC Substrate Kit for peroxidase; Vector Laboratories, Burlingame/USA

Formalin

Rotihistofix 4%, Phosphat-gepuffert, pH 7,2; Roth, Karlsruhe/D

Fötale Kälberserum (FCS)

Seromed / Biochrom KG, Berlin/D

Fungizone (Amphotericin B)

250 UG/ml; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

H₂O dest.

Universitätsapotheke Tübingen

H₂O₂ 30%

Merck, Darmstadt/D

Hämatoxilin

Merck, Darmstadt/D

Insulin-Transferrin-Selenium

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Material und Methoden

Kernechtrot

Merck, Darmstadt/D

Nährmedium

Dulbecco´s MEM / NUT Mix F12 (Ham); Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Paraffin

57-60°C; Merck, Darmstadt/D

PBS-Puffer

Dulbecco´s Phosphate buffered saline 0,0095 M; Cambrex Bio Science, Verviers/B
PBS-Tabletts; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

PCR-Kit

Taq DNA-Polymerase; Boehringer Mannheim/D

Penicillin-Streptomycin

10.000 U/mg Pen, 10.000µg/ml Str.; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Phenylhydrazin

Merck, Darmstadt/D

RNA-Extraktionskit

RNeasy Minikit (250); Quiagen, Maryland/USA

Titriplex III

EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat; Merck, Darmstadt/D

Trizma Base

Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Trypsin EDTA (1x)

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Vitamine

MEM Vitamins Solution (100x); Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Waschdetergenz

Tween 20; Merck, Darmstadt/D

Wasserdeseinfektion

Acryl AquaClean; WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden/D

Xylol p.a.

Merck, Darmstadt/D

Primer-Sequenzen

Koll. α_1 up	5'-AGC GCT GGT TTC GAC TTC AGC TTC C-3'
Koll. α_1 low	5'-CAT CGG CAG GGT CGG AGC CCT-3'
Koll. II up	5'-CTG GCT CCC AAC ACT GCC AAC GTC-3'
Koll. II low	5'-TCC TTT GGG TTT GCA ACG GAT TGT-3'
MMP 1 up	5'-GGT GAT GAA GCA GCC CAG-3'
MMP 1 low	5'-CAG TAG AAT GGG AGA GTC-3'
MMP 2 up	5'-CCA CGT GAC AAG CCC ATG GGG CCC-3'
MMP 2 low	5'-GCA GCC TAG CCA GTC GGA TTT GAT G-3'
MMP 3 up	5'-CCT GGG ACG CCA GCC AAC TGT G-3'
MMP 3 low	5'-TGC TTG GGA AAG CCT GGC TCC AT-3'
MMP 8 up	5'-GCC TCG CTG TGG AGT GCC TGA CA-3'
MMP 8 low	5'-GCG AGC CCC AAA GAA TGG CCA AA-3'
BMP 2 up	5'-GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC-3'
BMP 2 low	5'-TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA ACT CG-3'
TGF β_1 up	5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T-3'
TGF β_1 low	5'-AGG CTC CAA ATG TAG GGG CAG G-3'
iNOS up	5'-ACA TTG ATC AGA AGC TGT CCC AC-3'
iNOS low	5'-CAA AGG CTG TGA GTC CTG CAC-3'
IL-1 up	5'-ATG GCA GAA GTA CCT AAG CTC GC-3'
IL-1 low	5'-A CAC AAA TTG CAT GGT GAA GTC AGT T-3'
IL-6 up	5'-ATG AAC TCC TTC ACA AGC GC-3'
IL-6 low	5'-G AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG-3'
IL-18 up	5'-GCT TGA ATC TAA ATT ATC AGT C-3'
IL-18 low	5'-GAA GAT TCA AAT TGC ATC TTA T-3'

Hergestellt von MWG-Biotech AG, Ebersberg/D

Antikörper

Koll. I	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
Koll. II	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
Koll. III	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
Koll. IV	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
MMP 1	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
MMP 3	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
MMP 8	Maus IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
iNOS	Kaninchen IgG; Biomeda
IL-1RA	Kaninchen IgG; Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D
AS02	Maus IgG

2.1.3 Scaffold-Fabrikate

PLLA (Institut für Textilverarbeitung: ITV Denkendorf/D):

Poly-L-Lactid, plasmasterilisiert, hydrolytisch abbaubarer
Spinnfaservliesstoff

Mittlere Porengröße: 111,0µm; Porenvolumen 94-95%

Filamentdurchmesser: 18µm

LG 9010 (ITV Denkendorf/D):

Copolymer 90% L-Lactid/10% Glykolid, plasmasterilisiert, hydrolytisch
abbaubarer Spinnfaservliesstoff

Mittlere Porengröße: 73µm; Porenvolumen 94-95%

Filamentdurchmesser: 13-15µm

Pelvicol (CR Bard Inc., New Jersey/USA):

Kollagenvlies, gammasterilisiert, Kollagen I aus porciner Dermis

CMI (Sulzer/CH):

Collagen meniscus implant, poröse Matrix aus Kollagen I (bovine Achillessehne) + Glykosaminoglykanen, plasmasterilisiert, biologisch resorbierbar

Scheinbare Dichte: 0,2g/cm³

Porengröße: 50-100µm

2.1.4 Humanes Operationsmaterial

Für die Anzucht von humanen Meniskuszellkulturen wurde Meniskusgewebe aus Knieoperationen der orthopädischen Universitätsklinik Tübingen verwendet. Die Operationsindikation war jeweils Gonarthrose, das Operationsverfahren die endoprothetische Versorgung, so dass stets Meniskusgewebe ohne Folge für den Patienten entnommen werden konnte. Es wurden nur äußerlich unauffällige Menisci verwendet.

Es handelte sich um sechs Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 65,5 Jahren, davon waren zwei Patienten männlichen Geschlechtes. Bei fünf Patienten wurde eine bikondyläre Knie totalprothese (Genesis-KTP), bei einem Patienten eine unikondyläre Schlittenprothese eingesetzt.

Genauere Daten zu den Patienten finden sich in folgender Tabelle. Die Namen der Patienten werden aus Datenschutzgründen nicht genannt.

Material und Methoden

Tabelle 1: Patientendaten

Patient	Geschlecht	Relevante Diagnosen	Therapie
M1	M	Diagnose: Pagonarthrose li. Nebendiag.: 1-Gefäß-KHK, Diabetes mell. I, Z.n. Herzinfarkt '94	Bikondyläre KTP li.
M2	F	Diagnose: Gonarthrose li.	Bikondyläre KTP li.
M3	F	Diagnose: Gonarthrose re.	Bikondyläre KTP re.
M4	F	Diagnose: Varusgonarthrose li.	Unikondyläre mediale Schlittenprothese li.
M5	F	Diagnose: Gonarthrose li. Nebendiagnose: Z.n. Colon-CA '94, Z.n. Resektion singulärer Lebermetastasen '95, Penicillin-Allergie	Bikondyläre KTP li.
M6	M	Diagnose: Medial betonte Gonarthrose re.	Bikondyläre KTP re.

2.2 Methoden

2.2.1 Studienaufbau

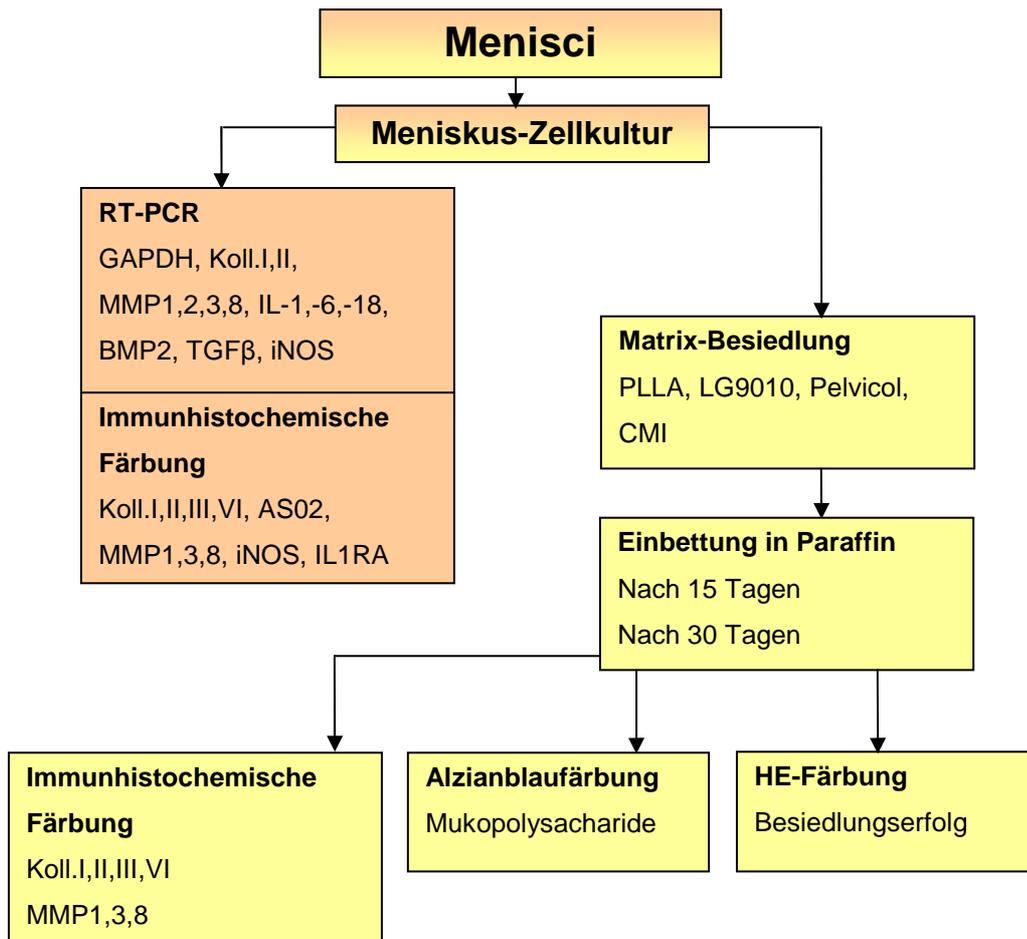


Abbildung 5: Flussdiagramm Studienaufbau

Aus dem kompletten Meniskusmaterial eines Patienten (n=6) wurde eine Meniskuszellkultur angelegt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen aufgeteilt: ein Teil wurde für die Zellcharakterisierung (Polymerasekettenreaktion = PCR, Immunhistochemie) zum Zeitpunkt t_0 der Übersiedlung verwendet. Ein anderer Teil wurde auf die vier Trägermaterialien

übersiedelt, nach 15 bzw. 30 Tagen in Paraffin geschnitten und auf Synthesemuster (Immunhistochemie, Alzianblaufärbung) und Besiedlungserfolg (Hämatoxylin/Eosin = HE-Färbung) hin untersucht

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Sämtliche Arbeiten, die mittelbar oder unmittelbar mit der Zellkultur zu tun hatten, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern.

Dazu gehörte das Arbeiten in der Sterilarbeitsbank, in der durch jeweils vorausgehende UV-Bestrahlung und desinfizierende Reinigung die Keimzahl reduziert und durch einen permanenten Luftstrom von 4m/s Staubpartikel und etwaige andere Verunreinigungen minimiert wurden. Sterile Arbeitsinstrumente sowie desinfizierte Schutzhandschuhe ergänzten die Vorsichtsmaßnahmen. Auch alle Chemikalien und Zusätze wurden unter diesen Bedingungen geöffnet und verwendet, sowie gegebenenfalls sterilfiltriert.

2.2.2.2 Anlage einer humanen Meniskuszellkultur

Der intraoperativ entnommene Meniskus wurde in sterile Kochsalzlösung eingebracht und bei 4°C gelagert.

Mit Hilfe einer Pinzette und zweier Skalpelle wurde sämtliches Meniskus-fremde Gewebe (v.a. Synovia) entfernt und anschließend der Meniskus breiartig zerkleinert, um für den späteren Kollagenaseverdau eine möglichst große Oberfläche zu schaffen. Die Zugabe von Dulbeccos Phosphat gepufferter Saline (DPBS) verhinderte die Austrocknung.

Anschließend wurde der Gewebebrei einer zweimaligen Waschprozedur unterzogen, indem man eine Suspension aus Gewebe und ausreichend DPBS in einem 50ml-Röhrchen bei 4°C und 1500 Umdrehungen pro Minute jeweils 7

Minuten lang zentrifugierte. Der Überstand bestehend aus DPBS, Fett- und Blutanteilen wurde jeweils abgesaugt.

Um nun die nicht erwünschte Interzellulärsubstanz zu beseitigen, wurde der Gewebeprei mit 6ml 0,4% Kollagenase-Lösung versetzt und für 4h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit folgten wiederum 2 Waschschriffe, nun mit Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM), um die überschüssige Kollagenase und das verdaute Material zu entfernen.

Zuletzt wurde das Zellpellet mit Vollmedium suspendiert und in 250ml Kulturflaschen und 6-Wellplatten überführt. Hierfür bot es sich an, in den Kulturflaschen 10ml Vollmedium vorzulegen und 4ml Zellsuspension hinzuzufügen, entsprechend in den 6-Wellplatten 2ml Vollmedium plus 0,5ml Zellsuspension. Alle Kulturträger wurden nun im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert.

2.2.2.3 Herstellung des Vollmediums

Für die Zellkulturen wurde 20% FCS (fetales Kälberserum)/DMEM-Vollmedium verwendet, welches bei 4°C gelagert und erst kurz vor Gebrauch bei 37°C im Wasserbad angewärmt wurde.

Zu 500ml DMEM Nutrient Mix/F12 Grundmedium wurden 50ml FCS, 10ml Penicillin/Streptomycin, 6ml Fungizone (Amphotericin B), 12ml MEM Vitaminlösung, und 0,5ml ITS (Insulin-Transferrin-Selenium) hinzugefügt.

FCS, Penicillin/Streptomycin, Fungizone und die Vitaminlösung waren stets bei -20°C gelagert und wurden erst unmittelbar vor Gebrauch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. ITS und das Grundmedium lagerten im 4°C-Kühlschrank.

Vor Gebrauch war das FCS 30min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert, anschließend mit 1g Aktivkohle versetzt und für 1h auf dem Schüttler ausgeschüttelt worden um unerwünschte Bestandteile zu binden. Nach der nun folgenden Sterilfiltration war das FCS gebrauchsfertig.

2.2.2.4 Mediumwechsel

Der erste Mediumwechsel wurde nach 10 Tagen durchgeführt, um eine ungehinderte Adhärenz möglichst vieler Zellen sicherzustellen.

Alle folgenden Mediumwechsel fanden alle 3 Tage statt. Dadurch sollten den Zellen stabile pH- und Nährbedingungen geboten werden. Dem Vollmedium war auch ein pH-abhängiger Farbindikator beigelegt, der durch angehäuften Stoffwechselprodukte der proliferierenden Zellen und damit einem sinkenden pH in einen gelblichen Farbton umschlägt, bei einem steigenden pH dagegen, beispielsweise durch verminderten CO₂-Gehalt, einen violetten Farbton annimmt.

Bei dem Mediumwechsel wurde das alte Medium mittels einer Pasteurpipette und einer Absaugpumpe unter sterilen Rahmenbedingungen schonend abgesaugt, um die haftenden Zellen nicht zu beschädigen. Daraufhin folgte die Zugabe des neuen Vollmediums, jeweils 14ml pro Kulturflasche und 2,5ml pro Well-Mulde.

2.2.3 Zellernte

Damit die gewachsenen Zellen für die Charakterisierung bzw. die Besiedlung der Kollagen- und Polymermatrices zur Verfügung stehen konnten, mussten sie aus den Gewebekulturplatten und -flaschen abgeerntet werden. Da für jeden Patienten mehrere Flaschen und Platten angelegt worden waren, empfahl es sich, alle Zellen eines Patienten erst zu poolen und dann für die drei weiteren Bestimmungen (immunhistochemische Färbung, PCR, Matrixbesiedlung) aufzuteilen.

Im ersten Schritt musste das Vollmedium aus den Gewebe-Kulturbehältern abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen werden. Hierdurch sollten vor allem Proteine herausgewaschen werden, die den folgenden Ablösevorgang der Zellen mittels einer Trypsin-Lösung erschwert hätten. Der Erfolg dieses Ablösevorgangs ließ sich unter dem Lichtmikroskop beurteilen, so dass nach vollständiger Ablösung möglichst aller Zellen wieder

ca. 10ml Vollmedium in die Gewebe-Kulturbehälter hinzugegeben wurde, insbesondere um das Trypsin zu inaktivieren und eine Schädigung der Zellen zu verhindern.

Nun wurde die gesamte Suspension aus den Behältern in ein 50ml Röhrchen überführt und 4min bei 4°C und 1000U/min zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, und das Zellpellet nun wieder mit 40ml Vollmedium suspendiert.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskopes (Leitz) durchgeführt, die Färbung der Zellen geschah mit Trypanblau im Verhältnis Zellsuspension : Trypanblau = 1 : 1. Tote Zellen stellten sich in dieser Färbung dunkelblau dar, da das Trypanblau durch die defekte Zellmembran ungehindert eindringen konnte.

Ein leicht befeuchtetes Deckglas wurde auf die Zählkammer aufgesetzt, der richtige Sitz des Deckglases konnte mit der Präsenz der sogenannten Newton-Ringe erkannt werden.

Die gut suspendierte und gefärbte Zellsuspension wurde an den Rand des Deckglases pipettiert und durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen.

Die Auswertung erfolgte durch Zellzählung in den vier großen Eckquadraten. Nach Einsetzen des Ergebnisses in die folgende Formel

$$\frac{n}{4} \cdot 10^4 \cdot 40ml$$

ließ sich die Zellzahl bestimmen.

2.2.5 Besiedelung der Trägermaterialien

2.2.5.1 Präparation und Lagerung der Trägermaterialien

PLLA und LG9010-Vliese wurden von der Firma ITV-Denkendorf in runder Form mit einem Durchmesser von 8mm gestanzt und Plasma-sterilisiert

verpackt. Die weitere Lagerung erfolgte trocken in einzelnen sterilen 50ml-Röhrchen.

Pelvicol wurde gamma-sterilisiert in einem Stück der Größe 4cm x 7cm mit steriler Kochsalzlösung getränkt verpackt. Nach Zurechtschneiden in kleine Stücke mit 8mm Durchmesser lagerten diese separat in sterilem PBS-Puffer in 50ml-Röhrchen.

Auch das CMI war am Stück Plasma-sterilisiert verpackt, wurde in kleine Stückchen mit 8mm Durchmesser geschnitten und separat in 50ml-Röhrchen trocken gelagert.

2.2.5.2 Besiedlung der Trägermaterialien

Für die Besiedelung der vier Scaffold-Typen (PLLA, LG9010, Pelvicol, CMI) wurde mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Scaffold gearbeitet. Es wurden pro Patient je zwei Exemplare jedes Scaffoldtypes besiedelt um die Beurteilung des Besiedlungserfolges an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten zu ermöglichen.

Dazu wurden aus der Zellsuspension (s. 2.2.3 Zellernte) $4 \cdot 10^6$ Zellen auf vier 50ml Röhrchen verteilt und diese 4min bei 1000U/min und 4°C zentrifugiert. In dieser Zeit ließ sich ein weiterer Teil der Zellen für die immunhistochemischen Färbungen auf 24-Well-Platten aussäen (s. 2.2.6.1 Immunhistochemie an der in-vitro-Zelkultur) und der Rest der Zellsuspension bei 4°C bis zur RNA-Extraktion (s. 2.2.7.2 RNA-Extraktion) lagern, um die Ernte-bedingte Expression von früh exprimierten Genen zu drosseln.

Der Überstand der vier Röhrchen wurde verworfen und das Zellpellet nun in jeweils 1,4ml Vollmedium aufgenommen.

Jetzt wurden die Scaffold-Typen so auf die Röhrchen und damit die hochkonzentrierte Zell-Mediumsuspension verteilt, dass sich in jedem der vier Röhrchen zwei Trägermaterialien des gleichen Fabrikats befanden. So war gewährleistet, dass die gleichen Fabrikate auch die gleichen Ausgangsbedingungen bei der Zellbesiedlung hatten und somit der Vergleich der Zelldichte und -verteilung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten möglich war.

Die Trägermaterialien wurden mit den Zellen drei Stunden im Brutschrank inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Dabei war es wichtig,

Material und Methoden

die 50ml-Röhrchen leicht aufzuschrauben, um die CO₂-Atmosphäre des Brutschrankes den Zellen zugänglich zu machen.

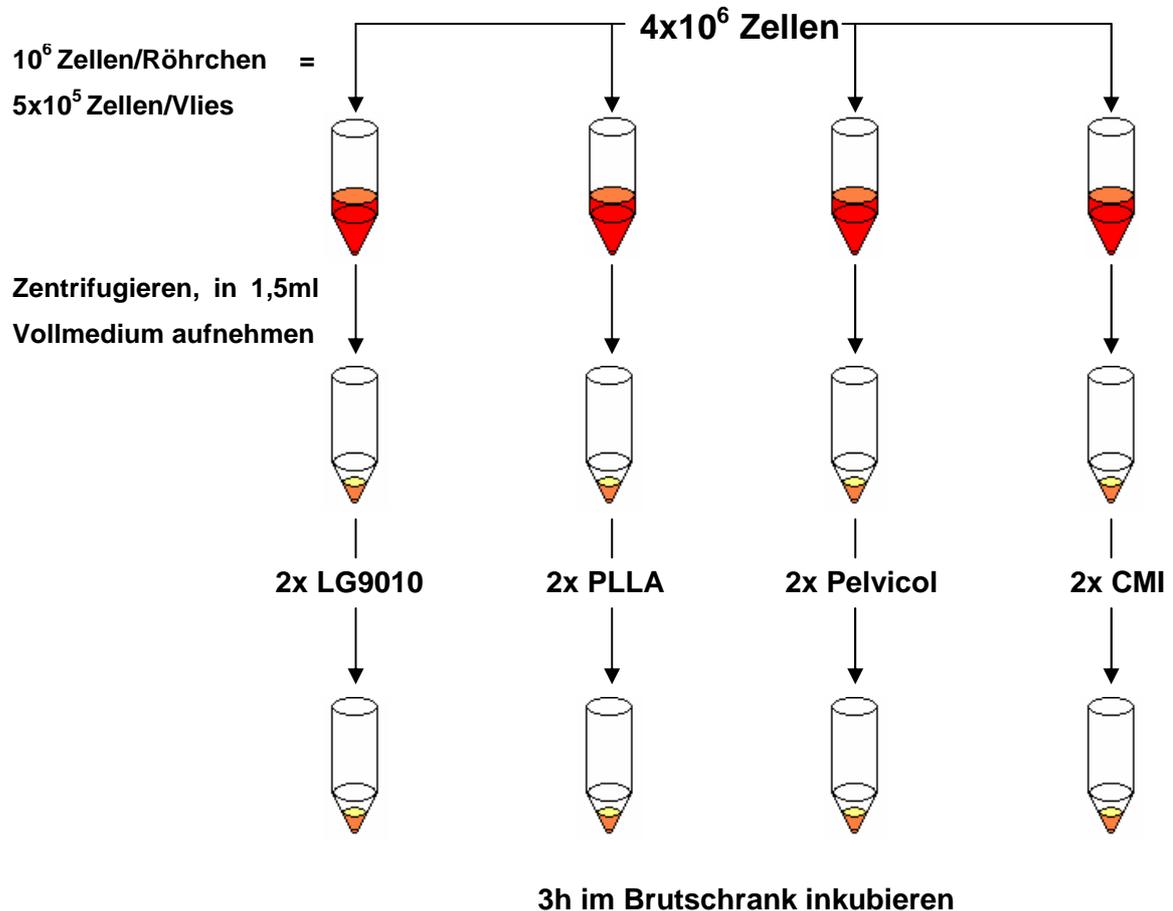


Abbildung 6: Besiedlungsschema

Nach drei Stunden wurden die Trägermaterialien getrennt voneinander auf 24-Well-Platten überführt. Der Rest der Zell-Mediumsuspension wurde nun auf die jeweils zugehörigen Trägermaterialien vorsichtig aufpipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von einer Stunde im Brutschrank, bevor die Well-Mulden mit 750µl Vollmedium geflutet wurden.

2.2.5.3 Mediumwechsel

Durch das geringe Mediumvolumen pro 24-Well-Mulde bei gleichzeitig hoher Zellkonzentration war der Mediumwechsel an jedem dritten Tag notwendig. Dabei wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette und einer Absaugpumpe vorsichtig abgesaugt und anschließend frisches Medium mit gleichmäßiger Flussgeschwindigkeit aufpipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, unnötige Verwirbelungen zu vermeiden, um die adhärennten Zellen nicht zu lösen.

2.2.6 Immunhistochemische Färbungen

Bei der immunhistochemischen Färbung macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass ein sogenannter Primär-Antikörper an ein spezifisches Antigen eines Produktes der Zelle bindet, sofern dieses Produkt exprimiert wurde. Um die erfolgte Antikörper-Antigen-Bindung sichtbar zu machen, wird im zweiten Schritt ein Sekundär-Antikörper eingesetzt, der an den Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper muss dabei gegen die Tierspezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper isoliert wurde. Der Sekundärantikörper ist zusätzlich mit einem Enzym gekoppelt (in unserem Fall Peroxidase), welches in einer hinzugegebenen Farbstoffreagenz einen Farbstoff umsetzt. Erfolgt ein Farbumschlag, so ist ein Zellprodukt immunhistochemisch nachgewiesen.

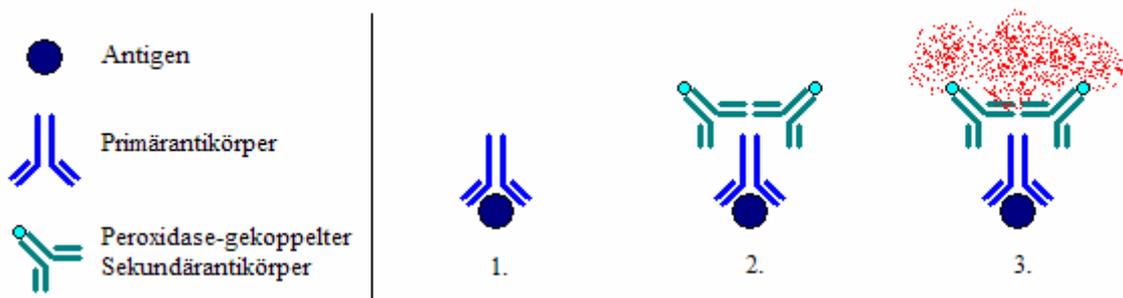


Abbildung 7: Prinzip der Immunhistochemie

2.2.6.1 Immunhistochemie an der in-vitro-Zellkultur

Herstellung der Reagenzien:

PBS-Puffer: eine PBS-Tablette (Invitrogen)/ 500ml destilliertes Wasser

0,1% Phenylhydrazin: 5µl Phenylhydrazin/5ml PBS-Puffer.

1% BSA: 0,5g bovines Serum- Albumin/50ml PBS-Puffer

0,1% Tween-Waschlösung: 500µl Tween-20 Detergenz/500ml PBS-Puffer.

Vorbereitung:

Nach der Zellernte (s. 2.2.3 Zellernte) wurden 4×10^5 Zellen auf 12 Well-Mulden einer 24-Well-Platte (Greiner) übersiedelt und diese wiederum über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen konnten so adhären werden und einen homogenen Zellrasen ausbilden, was zu einem natürlicheren Zellbild und damit qualitativ hochwertigeren Färbeergebnissen führte.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen zwei Waschschritten mit PBS-Puffer unterzogen, um Stoffwechsel- und Abfallprodukte der Zellen zu entfernen. Dazu wurde zuerst das Vollmedium abgesaugt, anschließend 0,2ml PBS Puffer pro Well-Mulde zugegeben und die ganze Platte für 2min mit Hilfe eines Schüttlers geschwenkt. Der Überstand wurde schließlich entfernt und die Prozedur wiederholt.

Nach einer kurzen Lufttrocknungszeit konnte man die Zellen dann mit wiederum je 0,2ml gekühltem 100%-Ethanol fixieren. Die Einwirkzeit betrug 5min bei -20°C, das Ethanol wurde anschließend abgesaugt.

Um nun etwaige endogene Peroxidasen zu entfernen, die das spätere Ergebnis hätten verfälschen können, wurden die Zellen nun mit 0,1% Phenylhydrazin/PBS-Lösung versetzt, die nach 30min wieder entfernt werden konnte.

Eine Zugabe von je 0,2ml 1% BSA/PBS-Lösung hatte den Zweck, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, durch die ebenfalls ein falsch positives Ergebnis hätte entstehen können. Nach einer Einwirkdauer von 1h bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt.

Material und Methoden

Primär-Antikörper:

Schließlich konnten 0,2ml des entsprechenden ersten Antikörpers in der für den jeweiligen Antikörper spezifischen Verdünnung mit 1% BSA/PBS aufgetragen werden. Inkubiert wurde jetzt wieder über Nacht bei einer Temperatur von 4°C. Dies hatte zwar den Nachteil, dass die Antigen-Antikörper-Bindung langsamer von statten ging, der entscheidende Vorteil war aber, dass diese Bindung durch die Temperatur an Spezifität gewann¹².

Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgesaugt und die Zellen wurden einem viermaligen Waschgang unterzogen, dreimal mit einer 0,1% PBS-Tween-Lösung, einmal nur mit PBS. Es wurden jeweils 0,2ml/Well-Mulde der entsprechenden Lösung aufgetragen, die 24-Well-Platte für 5min auf einem Schüttler positioniert und jedes Mal der Überstand verworfen. Dies hatte den Zweck, alle Antikörper, die keine Bindung eingegangen waren, zu entfernen.

Sekundär-Antikörper:

Nach diesem Waschgang wurde der 2. Antikörper auf die Zellen gegeben. Dieser Antikörper bindet Tier-spezifisch jeweils nur an denjenigen ersten Antikörper, der dem entsprechenden Tier (Kaninchen, Ziege, Maus,...) entstammt, gegen das der zweite Antikörper gerichtet ist. Entsprechend musste der zweite Antikörper zu dem ersten jeweils passend ausgewählt werden. Auch hier genügten 0,2ml pro Well-Mulde, die ganze Platte wurde dann bei 37°C und 5% CO₂ für 2h inkubiert.

Im folgenden wurden die Zellen erneut einer viermaligen Waschprozedur unterzogen, indem diese 3 mal 5min mit 0,2ml 0,1% PBS-Tween-Lösung/Well-Mulde und einmal 5min mit 0,2ml PBS/Well-Mulde auf dem Schüttler gewaschen und der Überstand jeweils abgesaugt wurde. Auch hier wurde das Ziel verfolgt alle freien Antikörper zu entfernen.

Färbung:

Die Färbung wurde mit einem Färbekit für Peroxidase (Vector Laboratories) durchgeführt. Jede Well-Mulde wurde also mit je 0,2ml einer Lösung bestehend aus 5ml destilliertem Wasser, 2 Tropfen einer Pufferlösung, 3 Tropfen einer 3-

Amino-9-Ethylcarbazol-Lösung (AEC) und 2 Tropfen einer Wasserstoffperoxidlösung für 10-30min inkubiert. Da der zweite Antikörper mit Peroxidase konjugiert war, ergab sich in jeder Well-Mulde, in der eine Antikörper-Antikörper-Antigen-Bindung stattgefunden hatte eine makro- und mikroskopisch sichtbare Rotfärbung.

Nach einem erneuten Waschgang mit PBS wurden die Ergebnisse lichtmikroskopisch mit einem Photoapparat dokumentiert.

2.2.6.2 Immunhistochemie am Paraffinschnitt

Herstellung der Reagenzien:

PBS-Puffer: eine PBS-Tablette (Invitrogen)/ 500ml destilliertes Wasser

1% BSA: 0,5g bovines Albumin/50ml PBS-Puffer

0,9% H₂O₂: 3ml 30% H₂O₂/100ml H₂O

Vectastain ABC-Kit

Färbung:

Zuerst wurden die zu bearbeitenden Schnitte auf dem Objektträger mit einem Pap-Pen eingekreist. Dies erzeugte einen Fett-Wall um die Schnitt-Probe und sollte verhindern, dass aufgetragene Reagenzien von der Probe abfließen können.

Endogene Peroxidasen wurden nun durch dreißigminütige Inkubation im 3% H₂O₂-Bad eliminiert worauf zwei Waschgänge im PBS-Puffer-Bad mit der Dauer von je 5min folgten.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers im Vorfeld zu verhindern, wurden die Proben mit je 200µl einer Lösung bestehend aus 5ml 1% BSA-Lösung und einem Tropfen Normal-blocking-horse-serum (Vectastain ABC-Kit) 30min inkubiert.

Nach Entfernen dieser Lösung wurden je 300µl der entsprechenden in BSA gelösten Primärantikörper aufgetragen, welcher über Nacht bei 4°C einwirkte. Auch hier stand die Erhöhung der Bindungsspezifität im Vordergrund.

Auf zwei Waschgänge im PBS-Puffer-Bad mit der Dauer von je 5min folgten je 200µl eines biotinilierten, panspezifischen Sekundärantikörpers (Vectastain

ABC-Kit), der an Primärantikörper aus Ratten, Hasen und Ziegen bindet. Die erforderliche Lösung wurde aus 2,5ml 1%BSA, 1 Tropfen Normal-blocking-horse-serum und 1 Tropfen biotiniliertem Antikörper hergestellt und wirkte 1h30min unter Brutschrankbedingungen auf die Proben ein, ungebundene Antikörper wurden anschließend mittels PBS-Puffer ausgewaschen.

Es folgte eine 30minütige Inkubation mit einer sog. ABC-Komplex-Lösung, die aufgrund Ihrer amplifizierenden Wirkung die Sensitivität des Verfahrens erhöhen sollte.

Erneut folgte ein Waschgang mit PBS-Puffer, bevor die erfolgte Antikörper-Antikörper-Antigen-Bindung durch 10minütiges Einwirken des AEC-Reagenz nachgewiesen wurde.

Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun (2min) wurden die Präparate 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert.

Um eine längere Haltbarkeit der Präparate zu gewährleisten, wurden diese nun mit Eindeckmittel auf Wasserbasis (Aquatex, Merck) und Deckgläsern eingedeckt und bis zur fotografischen Dokumentation dunkel gelagert.

2.2.7 RT-PCR

2.2.7.1 Allgemeines und Prinzip

Mit Hilfe einer RT-PCR (reverse-Transkriptions-PCR) ist man in der Lage, spezifische Transkriptionsprodukte, also mRNA einer Zelle so zu amplifizieren, dass sie mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Dazu wird die mRNA zur sogenannten cDNA konvertiert. Der Nachweis einer spezifischen mRNA ist dabei von den Primern abhängig, die verwendet werden, da diese durch bilaterale Anlagerung den gewünschten Genbereich abgrenzen. Für die exponentielle Amplifikation ist eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase -> aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) verantwortlich.

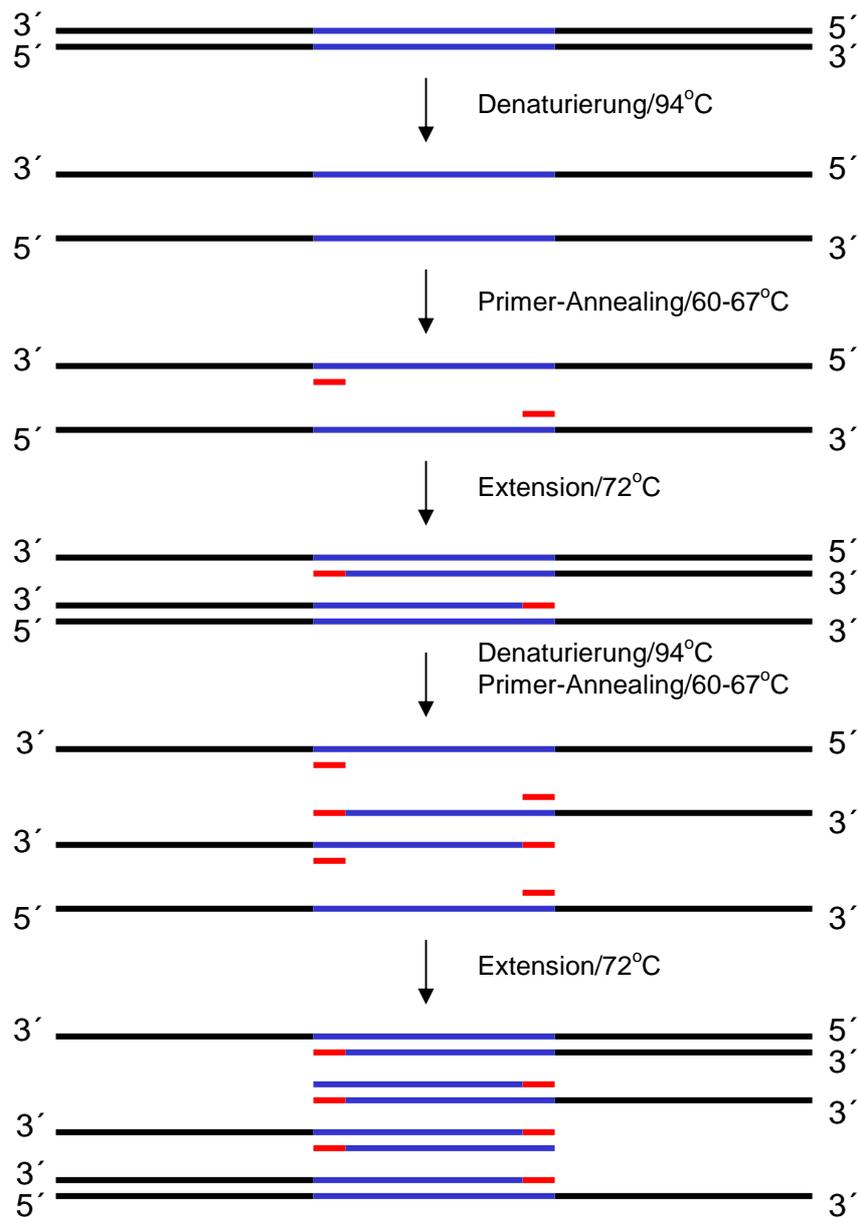


Abbildung 8: Prinzip der DNA-Amplifikation (nach Löffler-Petrides: Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag 1998)

Mit der Gelelektrophorese kann schließlich die Basenpaarlänge des PCR-Produkts grob festgestellt werden. Legt man eine Spannung an, so wandert die DNA zur Kathode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur \log [Basenpaarlänge]:

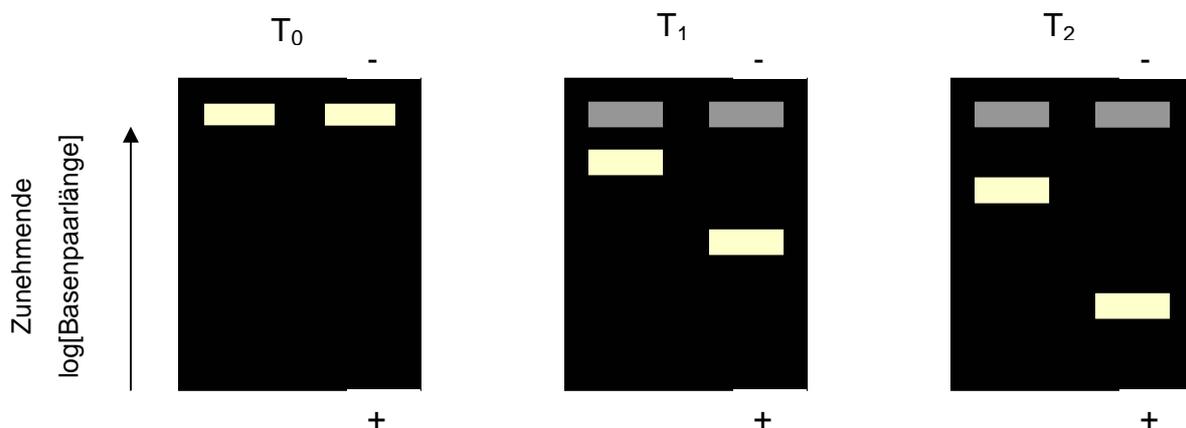


Abbildung 9: Schema Gelelektrophorese

2.2.7.2 RNA-Extraktion

Um letztendlich die für die PCR benötigte Form der DNA zu erhalten, war es unabdingbar, die mRNA aus den Zellen des Zellpellets (s. Zellernte) zu extrahieren bzw. zu isolieren.

Für die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy-Minikit der Firma Qiagen gearbeitet. Vor Beginn wurde 1ml des RLT-Puffers mit 10 μ l Mercaptoethanol versetzt, der RPE-Puffer wurde mit 100% Ethanol verdünnt.

Die Zell-Vollmediumsuspension, die bei der Zellernte hergestellt worden war, mußte vorab bei 4°C und 1500U/min 10 min zentrifugiert und anschließend der Vollmediumüberstand verworfen werden. Das Pellet wurde nun mit 1ml PBS versetzt und wiederum bei 4°C und 1000U/min für 10min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Um die Zellen zu lysieren, wurde das Zell-Pellet mit 350µl RLT-Pufferlösung und 350µl 70% Ethanol versetzt, und die Suspension mit Hilfe einer Insulinspritze homogenisiert. Dies musste solange durchgeführt werden, bis keine Zellklümpchen mehr zu sehen waren. Das gesamte Volumen wurde jetzt auf die Säule (SpinColumn) des Minikits aufgetragen, welche RNA aufgrund von Ionenaustauschereffekten bindet, und diese bei Raumtemperatur und 10000U/min 15s lang zentrifugiert.

Gewaschen wurde die Säule nun, indem 350µl RW1-Puffer aufgetragen und die Säule anschließend bei Raumtemperatur und 10000U/min 15s zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde verworfen. Jetzt wurden 10µl DNase I Stammlösung und 70µl RDD Puffer gemischt und auf die Säulenmitte aufgetragen und 15min bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen inkubiert, um die unerwünschte DNA zu eliminieren. Es folgte ein Waschschriff mit 350µl RW1-Puffer (s.o.), anschließend zwei Waschschriffe mit je 500µl RPE-Puffer, wobei nach dem zweiten Auftragen des RPE-Puffers nun 2min 20000U/min und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Um die Säule zu trocknen und auch den letzten Rest Ethanol aus der Säule zu entfernen wurde diese nach Verwerfen des Eluates nochmals 15s bei 20000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Zuletzt eluierte man die RNA. Dazu musste vorab die Säule in einen Eppendorfcup eingesetzt werden, um die RNA aufzufangen. Nun wurden 40µl RNase-freies ddH₂O auf die Säule aufgetragen. Nach 1min Zentrifugation bei 10000U/min und Raumtemperatur befand sich die RNA-H₂O-Suspension schließlich im Eppendorfcup.

Nach Entnahme der entsprechenden Menge für die RNA-Quantifizierung wurde die RNA bis zur Umschreibung in cDNA maximal 3h bei -20 °C gelagert.

2.2.7.3 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit einem Photometer (Jasco V530) der Firma Jasco. Dazu wurden 4µl RNA mit 196µl Ampuwa-Wasser versetzt (Verdünnung 1:50) und die Extinktion E gegen Ampuwa-Wasser bei 260nm und 280nm mit Hilfe einer Software der Firma Jasco gemessen. Die Extinktion („Auslöschung“) ist hierbei proportional zur Menge der RNA und beschreibt die

Absorption des Lichtes durch die RNA bei verschiedenen Wellenlängen. Da RNA bei 260nm ein Extinktionsmaximum hat, ist dies die Wellenlänge der Wahl für die Quantifizierung.

Der Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ beschreibt dabei die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Nach Einsetzen der Extinktion $E_{260\text{nm}}$ in die Formel

$$E_{260} \cdot 40 \cdot 50 \cdot 0,04$$

ließ sich die Menge der RNA berechnen.

2.2.7.4 cDNA-Synthese

Um die aus der Extraktion gewonnene RNA für die PCR nutzbar zu machen, ist es erforderlich, die Einzelstrang RNA in eine komplementäre Doppelstrang-DNA zu übersetzen.

Hierfür wurden Reagenzien aus dem RT-for-PCR-Kit der Firma Clontech verwendet.

Alle Reagenzien wurden schonend auf Eis aufgetaut. In einem Eppendorf-Cup wurden nun 25µl RNA mit 2µl Oligo(dT)₁₈primer versetzt und 2min bei 72°C inkubiert, um die RNA zu strecken und die Anlagerung des Oligo(dT)₁₈primers an den Poly-A-Schwanz der RNA zu ermöglichen. Damit die RNA nicht durch komplementäre Sequenzen größere Doppelstrangbereiche bilden konnte, wurde sie anschließend sofort wieder auf Eis gestellt.

Für die eigentliche cDNA-Synthese wurden 8µl eines Reaktionspuffers für stabile pH- und Salzverhältnisse, 2µl dNTP-Mix, 1µl rekombinanter RNase-Inhibitor zum Schutz der RNA und 2µl MMLV-Reverse-Transkriptase für die Katalyse des Umschreibeprozesses hinzugefügt, und die Mischung für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Für den Synthesestop sorgte eine abschließende vierminütige Phase bei 94°C. Die cDNA wurde schließlich bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.7.5 PCR

Für das Reaktionsgemisch wurden PCR-Reagenzien der Firma Roche verwendet. Alle Reagenzien wurden bei -22°C gelagert und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut. Die Taq-Polymerase wurde auch während des Gebrauchs auf Eis gelagert.

Das Reaktionsgemisch in einem Eppendorf-Cup bestand aus $26\mu\text{l}$ RNase freiem Wasser, $5\mu\text{l}$ 10xPCR-Puffer, $9\mu\text{l}$ MgCl_2 , $1\mu\text{l}$ 10mM dNTP-Mix, sowie je $1\mu\text{l}$ Upper- und Lower-Primer, um das gewünschte Gen zu amplifizieren. Das Gemisch wurde mit $2\mu\text{l}$ Taq-Polymerase versetzt. Schließlich wurden $5\mu\text{l}$ der cDNA (s. 2.2.7.4) hinzugegeben, die Reaktionslösung sorgfältig gemischt und kurz abzentrifugiert. Der Eppendorf-Cup mit der Reaktionslösung wurde nun in den vorgewärmten PCR-Block überführt (Warmstart) und das Programm gestartet.

2.2.7.6 Gelelektrophorese

Herstellung des Agarosegels:

6g Agarose wurden mit 10xTBE-Puffer auf 400ml aufgefüllt mit einem Magnet-Rührfisch versehen (Siedeverzug) und in der Mikrowelle 10min bei 600W aufgeköcht. Anschließend wurden $30\mu\text{l}$ Ethidiumbromid hinzugefügt, welches an DNA bindet und diese unter UV-Licht-Einstrahlung sichtbar macht.

150ml des auf 60°C abgekühlten Gels wurden nun in die Gelkammer gegeben. Nach vollständiger Abkühlung konnte die Gelkammer mit TBE-Puffer geflutet werden.

Gelelektrophorese:

$20\mu\text{l}$ jeweils eines PCR-Produktes wurden mit $5\mu\text{l}$ PCR-Ladepuffer gemischt. Aus dieser Lösung wurden nun $20\mu\text{l}$ in eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Eine Tasche am Rand des Gels musste dabei mit $10\mu\text{l}$ eines Eichmarkers beschickt werden, um am Ende die Basenpaarlänge der einzelnen PCR-Produkte ermitteln zu können.

Material und Methoden

Bei einer Spannung von 60mV und einer Stromstärke von 40-60mA erfolgte schließlich die Gelelektrophorese. Die Banden konnten am Ende mit Hilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert werden

2.2.8 Herstellung von Paraffinschnittpräparaten

2.2.8.1 Einbettung in Paraffin

Die besiedelten Vliese wurden nach 15 und 30 Tagen Kultur im Brutschrank für jeweils max. 5 Tage in 4% Formalin fixiert und in einem Einbettautomat (Hypercenter XP) nach folgender Vorschrift entwässert und paraffiniert:

Tabelle 2: Protokoll Einbettautomat

1. Formalin 4%	37 °C	1h30min
2. Ethanol 70%	37 °C	1h
3. Ethanol 70%	37 °C	1h
4. Ethanol 96%	37 °C	1h
5. Ethanol 96%	37 °C	1h
6. Ethanol 100%	37 °C	1h
7. Ethanol 100%	37 °C	1h
8. Ethanol 100%	37 °C	1h
9. Xylol	37 °C	1h
10. Xylol	37 °C	1h30min
11. Paraffin	60 °C	1h
12. Paraffin	60 °C	2h

Das endgültige Einbetten in Paraffin geschah manuell mit einem Gewebeeinbettssystem (Tissue Tek III). Dabei wurde darauf geachtet, die Vliese senkrecht einzubetten, um nicht beim späteren Anschneiden u.U. die oberflächliche Zelllage zu verlieren.

2.2.8.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Der Paraffinblock wurde nun in den Tisch eines Schlittenmikrotoms eingespannt. Mit Hilfe eines C-Messers wurde der Block vorsichtig angeschnitten um eine plane Fläche für die folgenden Schnitte zu gewährleisten.

Es wurden nun 5µm dicke Schnitte des Präparates angefertigt und diese in einem Wasserbad bei 37 °C geglättet. Die Schnitte konnten dann auf beschichtete Objektträger (Super Frost plus) aufgezogen und auf dem 37 °C warmen Rand des Wasserbades 5min angetrocknet werden. Anschließend wurden die Objektträger für 12-24h im Brutschrank bei 55 °C inkubiert, um das Paraffin teilweise ablaufen zu lassen.

Für die Präparate der Trägermaterialien wurde jeder zehnte Schnitt verwertet, zwischen Schnitt 30 und 70 wurde jeder Schnitt verwertet.

2.2.8.3 Entparaffinieren der Schnitte

Um die Präparate nun mit histologischen und immunhistochemischen Techniken färben zu können, musste das überschüssige Paraffin vom Objektträger entfernt werden. Dies wurde realisiert, indem die Objektträger eine Reihe von absteigenden Alkoholkonzentrationen durchlaufen mussten:

3x10min Xylol

2x5min 100% Ethanol

5min 96% Ethanol

5min 80% Ethanol

5min 70% Ethanol

10s destilliertes Wasser

Die Präparate wurden dann sofort weiterverarbeitet oder in PBS-Puffer max. 1 Woche aufbewahrt.

2.2.9 Histologische Standardfärbungen

2.2.9.1 HE-Färbung am Paraffinschnitt

Herstellung der Farblösungen:

Mayers Hämalaun: 1g Hämatoxylin/200ml Aqua dest., nach 24h Zugabe von 200mg Natriumjodat, 50g Kaliumaluminiumsulfat, 50g Chlorhydrat, 1g Zitronensäure; Filtration, Auffüllen auf 1l (Aqua dest.)

Eosin: 0,1g Eosin/100ml 90% Ethanol + 1Tropfen Eisessig, Filtration

Um durch die Paraffinschnittpräparate der Trägermaterialien Besiedlungserfolg, Verteilung und Proliferation der Zellen beurteilen zu können, mussten diese mittels einer HE-Färbung sichtbar gemacht werden. Dabei wurde pro Scaffold jeder zehnte Schnitt angefärbt.

Die Präparate wurden dazu leicht abgetropft und für 8min in Hämalaun-Farbstofflösung inkubiert. Hämalaun färbt die basophilen Bestandteile, also v.a. das Chromatin des Zellkernes blau.

Durch anschließendes 10minütiges Wässern mit Leitungswasser wurde überschüssiger Farbstoff entfernt und eine tiefblaue Farbe der Zellkerne erreicht.

Es folgte eine 15s dauernde Inkubation in Eosin, welches die azidophilen Bestandteile des Zytoplasmas rötlich färbt.

Die Qualität des Färbeergebnisses wurde nun durch eine teilweise Entfärbung und Aufhellung in einer Reihe aufsteigender Alkoholkonzentrationen erreicht:

2s 80% Ethanol

2s 96% Ethanol

2x2min 100% Ethanol

3x5min Xylol

Es folgte das Eindecken der Präparate mit Eindeckmittel auf Xylolbasis (DePeX, Serva) und Deckgläsern.

2.2.9.2 Alzianblau-Färbung am Paraffinschnitt

Herstellung der Farblösungen:

Alzianblau: 1g Alzianblau/100ml 3% Essigsäure, Filtration

Kernechtrot: 0,1g Kernechtrot/100ml 5% Aluminiumsulfatlösung, Kochen, Filtration

Um neben den immunhistochemischen Färbungen weitere Informationen über die Matrixsynthese der Zellen in der dreidimensionalen Kultur zu erhalten, wurden diese einer Alzianblau-Färbung unterzogen. Alzianblau färbt saure Mucopolysaccharide türkis bis blau an.

Die Präparate wurden leicht abgetropft und 2min in 3% Essigsäure vorbereitet. Anschließend verblieben die Präparate 3h in der Alzianblau-Lösung, wurden danach 2min mit Leitungswasser gewässert und schließlich mit Kernechtrot gegengefärbt (Zellkerne rot). Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser folgte wieder die Aufhellung in der aufsteigenden Alkoholreihe:

2s 80% Ethanol

2s 96% Ethanol

2x2min 100% Ethanol

3x5min Xylol

Es folgte das Eindecken der Präparate mit Eindeckmittel auf Xylolbasis (DePeX, Serva) und Deckgläsern.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

Es wurden Meniskuszellkulturen von sechs Patienten (M1-M6) angelegt. Die durchschnittliche Kulturzeit bis zum geschlossenen Zellrasen betrug 46,83 Tage ($s=1,94$).

3.1.1 Zellzahl

Nach der obengenannten Kulturzeit wurden die Zellen abgeerntet und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, um die Zellen für die Weiterverarbeitung quantitativ aufteilen zu können.

Tabelle 3: Übersicht Ergebnisse Zellzahl

Patient	Gesamt-Zellzahl	Gewebekulturträger Gewebekulturflaschen/ platten	Aufteilung der Zellen		
			PCR	IHC	Trägermaterialien
M1	$3,25 \cdot 10^6$	2/2	$3,2 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^5$	
M2	$5,7 \cdot 10^6$	3/4	$1,08 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^5$	$4,27 \cdot 10^6$
M3	$5,6 \cdot 10^6$	3/4	$1,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$
M4	$5,6 \cdot 10^6$	3/4	$1,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$
M5	$5,9 \cdot 10^6$	3/3	$1,4 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^6$
M6	$7,5 \cdot 10^6$	3/6	$3,1 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$
$\bar{x} = 5,59 \cdot 10^6$ $s = 1,36 \cdot 10^6$					

Es wurden durchschnittlich $5,59 \cdot 10^6$ Zellen/Patient gezählt, bei einer Standardabweichung von $s = 1,36 \cdot 10^6$ Zellen/Patient.

Ergebnisse

3.1.2 RNA-Quantifizierung

Nach der Extraktion der RNA aus den Zellen wurden die Menge und die Reinheit der gewonnenen RNA mittels eines UV-Spectrometers bestimmt. Durch Einsetzen der Extinktion bei 260nm in die Formel

$$E_{260} \cdot 40 \cdot 50 \cdot 0,04$$

ergab sich die Menge der RNA in $\mu\text{g/ml}$. Durch den Quotient aus der Extinktion bei 260nm und 280nm konnte die Reinheit der RNA abgeleitet werden. Der Quotient sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Tabelle 4: Übersicht Ergebnisse RNA-Quantifizierung

Patient	$E_{260\text{nm}}$	$E_{280\text{nm}}$	RNA [$\mu\text{g/ml}$]	$E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$
M1	0,0438	0,0204	3,50	2,15
M2	0,1473	0,0754	11,78	1,95
M3	0,24875	0,12595	19,90	1,93
M4	0,16443	0,0846	13,15	1,94
M5	0,2175	0,1213	17,40	1,79
M6	0,1686	0,0935	13,49	1,80
			$\bar{x}=13,20$ $s=5,63$	$\bar{x}=1,93$ $s=0,13$

Es ergab sich eine durchschnittliche RNA-Menge von $13,20\mu\text{g/ml}$ bei einer Standardabweichung von $s=5,63$. Lediglich bei Patient M1 konnte nur eine geringe Menge RNA extrahiert werden.

Der Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ lag im Mittel bei 1,93 ($s=0,13$), allein bei Patient M1 wurde der optimale Bereich um 0,15 überschritten.

3.2 Zellcharakterisierung

3.2.1 RT-PCR

Um die angezüchteten Zellen zum Zeitpunkt der Übersiedlung auf die Vliese zu charakterisieren, wurde mittels RT-PCR das Expressionsmuster folgender Gene untersucht:

- Kollagen I, II
- Matrix-Metalloproteinase (MMP) 1, 2, 3, 8
- Interleukin (IL) 1, 6, 18
- Tumor Growthfactor (TGF) β_1
- Bone morphologic protein (BMP) 2
- induzierbare NO Synthetase (iNOS)

Als Referenz für die ungefähre RNA-Menge wurde zusätzlich eine PCR für das Transkript der GAPDH durchgeführt. Zum Vergleich wurde bei jedem Ansatz cDNA einer Chondrozyten-Kultur (K1) mitgeführt.

Aus zahlreichen Vorversuchen ergaben sich für die verschiedenen Primer jeweils optimale Annealing-Temperaturen sowie teilweise unterschiedliche $MgCl_2$ Konzentrationen im Reaktionsansatz:

Tabelle 5: PCR-Protokoll

Gen	Länge [bp]	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen	Puffer/ $MgCl_2$ [μ l]
GAPDH	983	94 °C /1min	60 °C /1min	72 °C /2min	33	5/9
Koll. I	466	94 °C /1min	64 °C /1min30s	72 °C /2min	33	5/9
Koll. II	414	94 °C /1min	65 °C /1min	72 °C /2min	30	7,5/6,5
MMP 1	438	94 °C /1min	64 °C /1min30s	72 °C /2min	33	7,5/6,5
MMP 2	400	93 °C /1min	60 °C /2min	72 °C /2min	33	7,5/6,5
MMP 3	425	94 °C /1min	64 °C /1min30s	72 °C /2min	33	5/9
MMP 8	414	94 °C /1min	64 °C /1min30s	72 °C /2min	33	7,5/6,5
IL 1	802	94 °C /1min	60 °C /1min30s	72 °C /2min	33	5/9

Ergebnisse

IL 6	628	94 °C /1min	60 °C /1min30s	72 °C /2min	33	5/9
IL 18	341	94 °C /1min	60 °C /1min30s	72 °C /2min	33	5/9
TGF β_1	161	94 °C /1min	60 °C /1min	72 °C /2min	33	5/9
BMP 2	671	93 °C /1min	60 °C /2min	72 °C /2min	33	5/9
iNOS	236	94 °C /1min	67 °C /1min	72 °C /2min	33	7,5/6,5

Bei im Vergleich zu Chondrozyten gleich stark ausgeprägter Koll. I Bande sah man bei den Fibrochondrozyten eine deutlich schwächere bis negative Koll. II Bande (Abb. 10).

Die Banden für MMP 1, 2, 3 und 8 waren sowohl bei Fibrochondrozyten als auch bei Chondrozyten gleichmäßig stark vorhanden (Abb. 11).

Während auch bei Interleukin-6 einheitlich deutliche Banden zum Vorschein kamen, konnte man bei den Chondrozyten keine Interleukin-1-Expression nachweisen. Bei Patient M4 und M6 sah man im Vergleich zu M1-M3 und M5 etwas schwächere Interleukin-1 Banden. Bei Patient M1 beobachtete man für Interleukin-18 eine geringfügig schwächere Bande im Vergleich zu den ansonsten einheitlich deutlichen Banden der Patienten M2-K1 (Abb. 12).

Für BMP 2 und TGF β_1 waren gleich starke Banden für Fibrochondrozyten und Chondrozyten erkennbar (Abb. 13).

Eine stärkere Bandenintensität war bei der Chondrozyten-cDNA schließlich noch für die induzierbare NO-Synthetase festzustellen (Abb. 13).

Ergebnisse

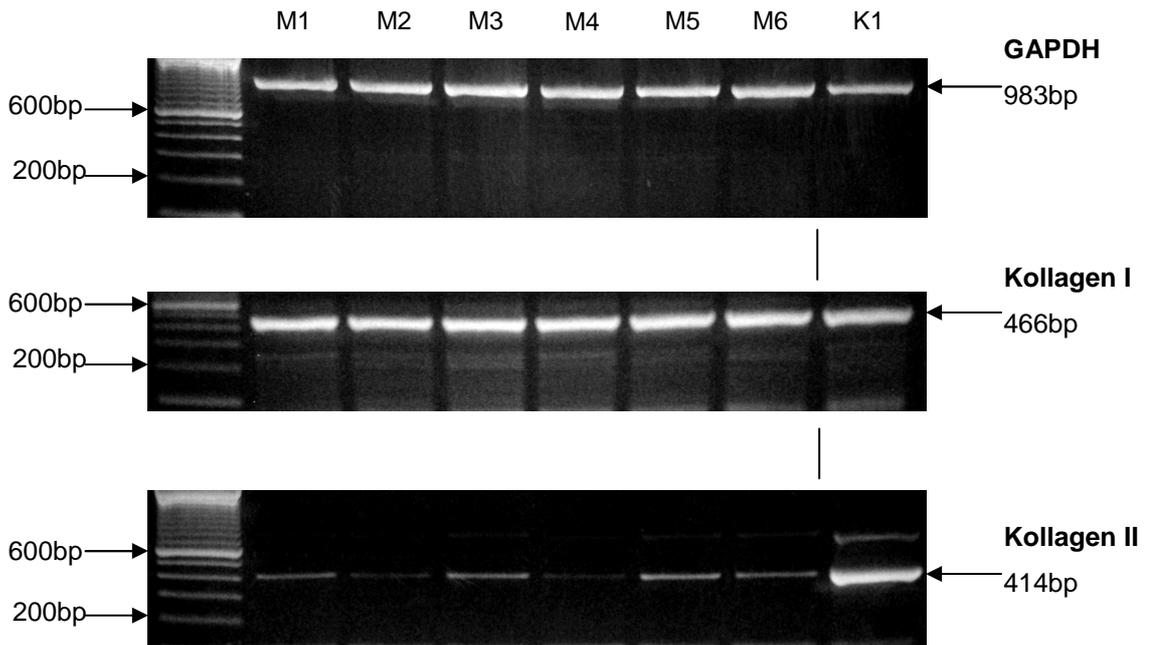


Abbildung 10: PCR-Ergebnis Koll. I, II

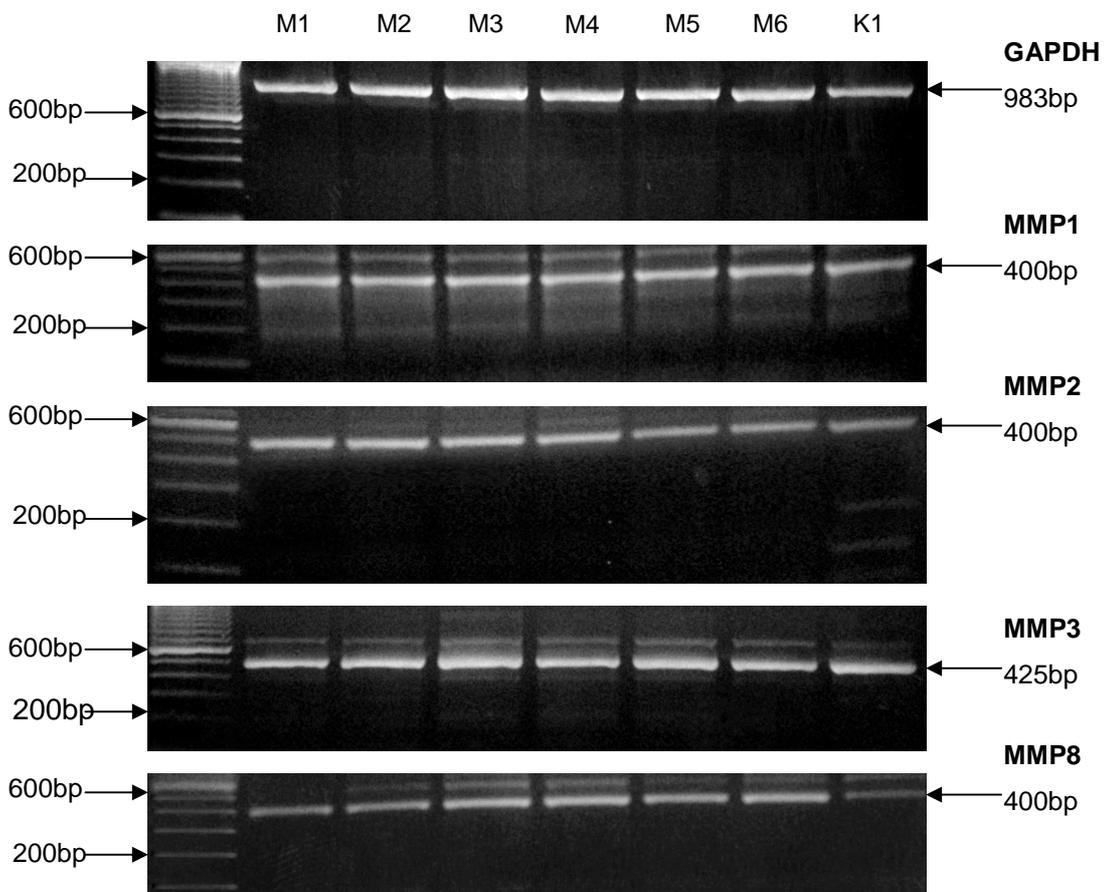


Abbildung 11: PCR-Ergebnis MMP1, 2, 3, 8

Ergebnisse

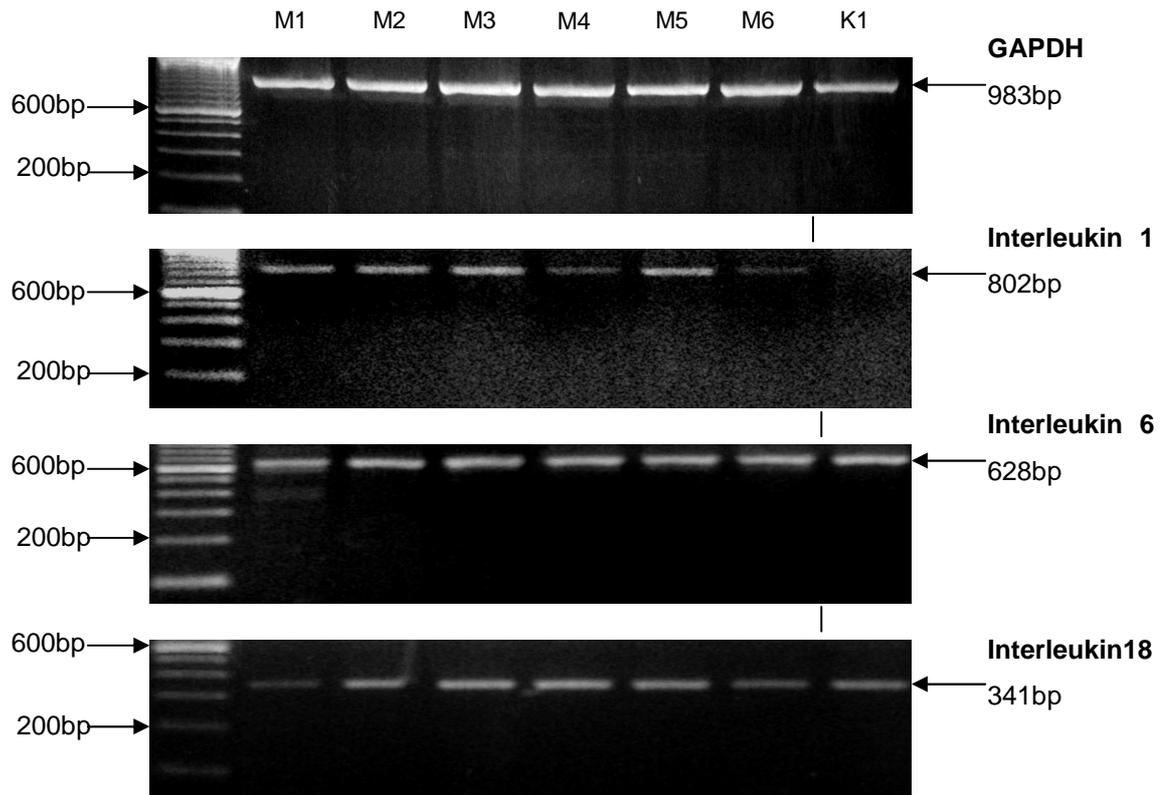


Abbildung 12: PCR-Ergebnis IL-1, -6, -18

Ergebnisse

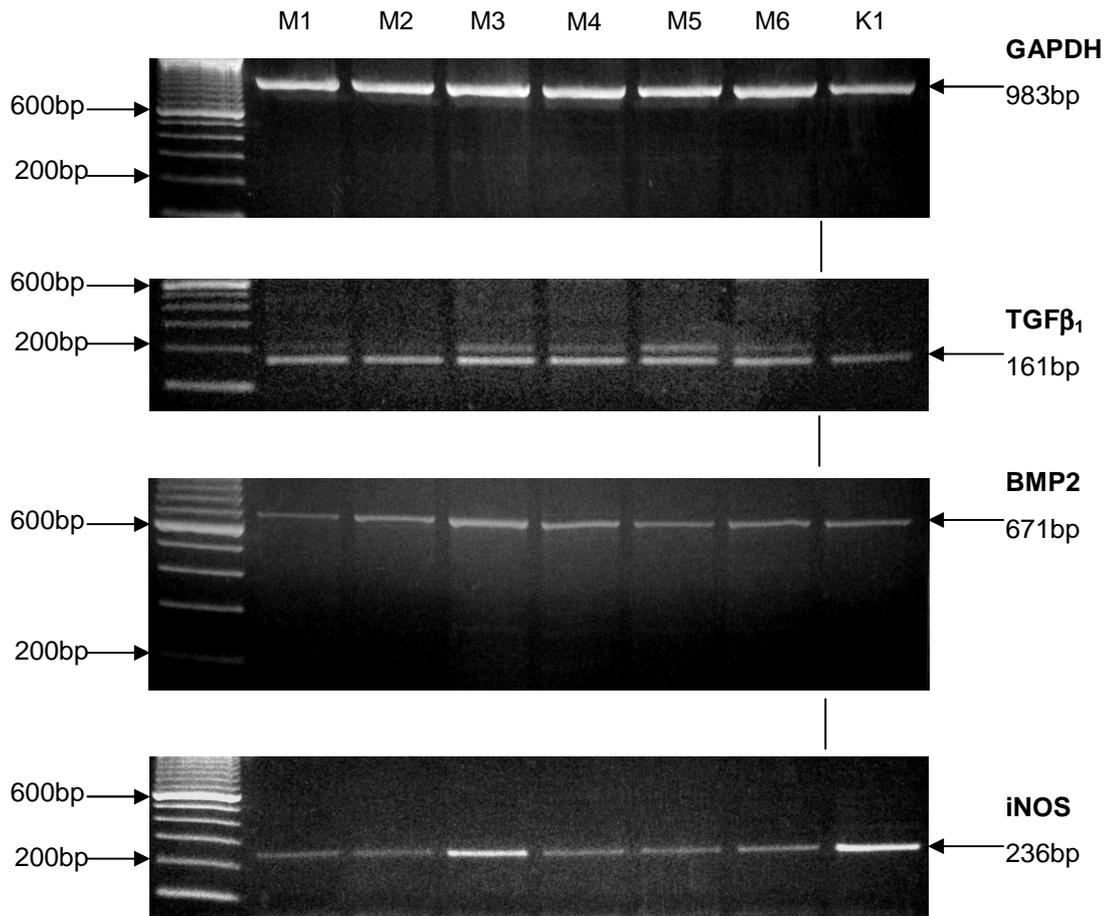


Abbildung 13: PCR-Ergebnis TGFβ, BMP2, iNOS

3.2.2 Immunhistochemie an der in-vitro Zellkultur

Zur Charakterisierung der Zellen wurden parallel zur Übersiedlung auf die Vliese neben der RT-PCR auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die Translationsprodukte der Zelle nachweisen zu können. Es wurden dabei Antikörper gegen Kollagen I, II, III, VI, MMP 1, 3, 8, iNOS, IL1RA und AS02 verwendet. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers 0,1% BSA-Lösung aufgetragen.

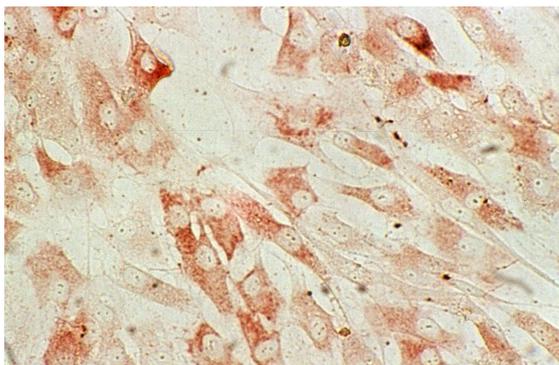


Abbildung 14: Koll. I (li.), Koll. II (re.)

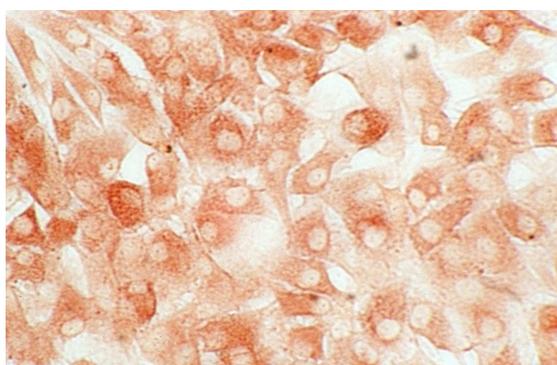
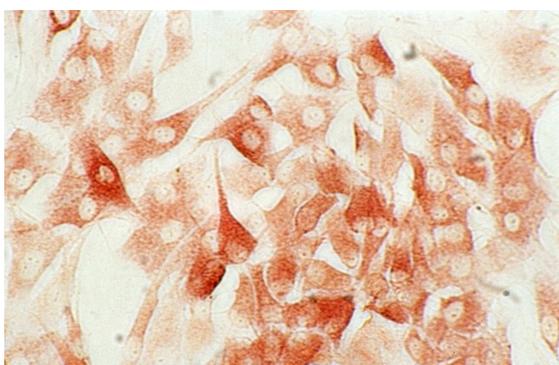


Abbildung 15: Koll. III (li.), Koll. VI (re.)

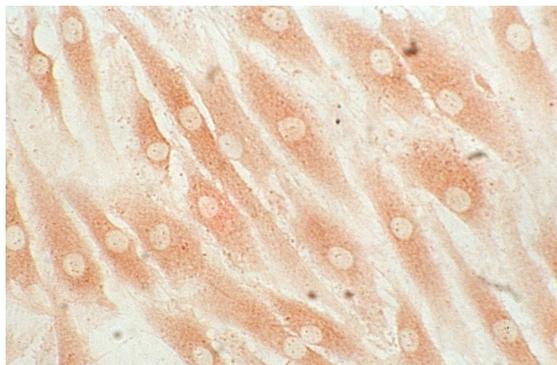
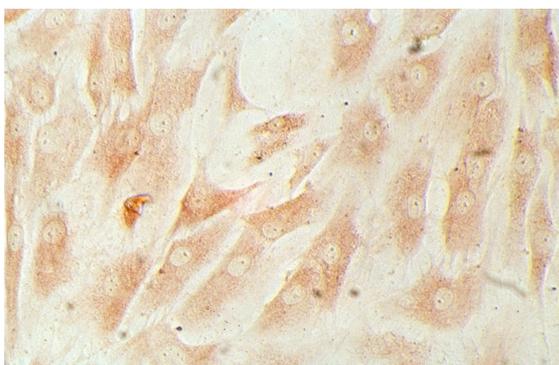


Abbildung 16: MMP1 (li.), MMP3 (re.)

Ergebnisse

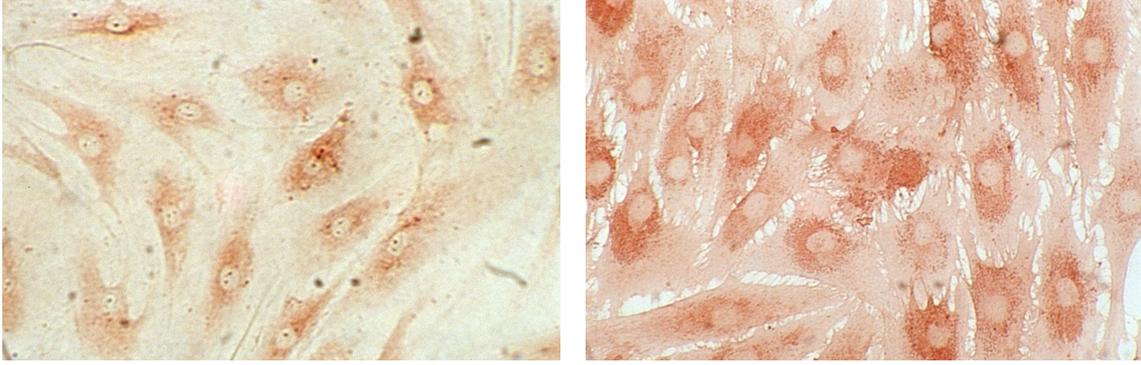


Abbildung 17: MMP8 (li.), AS02 (re.)

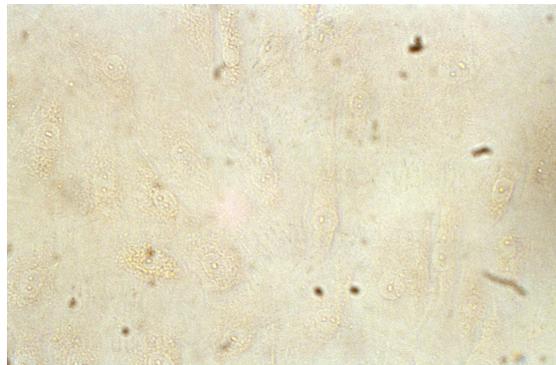


Abbildung 18: Neg. Kontrolle Anti-Maus

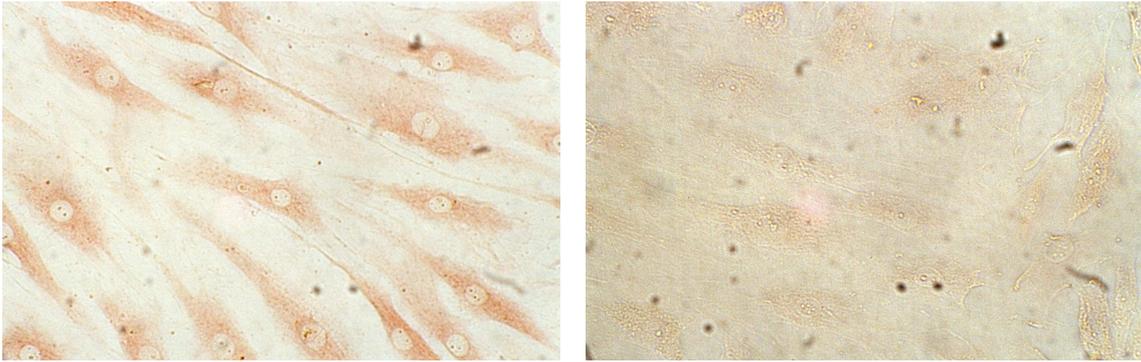


Abbildung 19: iNOS (li.), IL1-RA (re.)

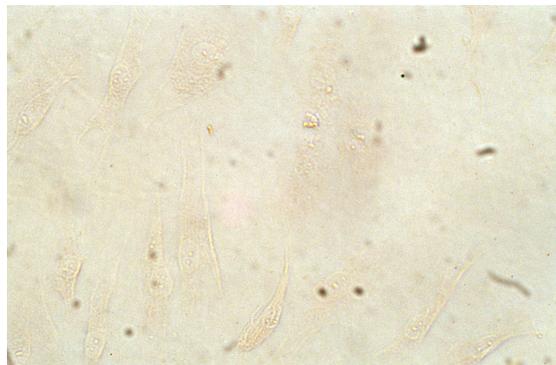


Abbildung 20: Neg. Kontrolle Anti-Kaninchen

Die immunhistochemischen Färbungen waren bei den Zellen stets positiv für Koll. I, III und VI, MMP 1, 3 und 8 sowie für die induzierbare NO-Synthetase und den Fibroblastenmarker AS02. Für Koll. II ergab sich eine deutliche Kernfärbung, das Zytoplasma war jedoch negativ (Abb.14). Der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist war nur bei zwei Patienten schwach positiv (Abb. 19). Bei einer Positivkontrolle an Chondrozyten wurde ein deutlich positives Ergebnis für Koll. II bei einer schwächer positiven Koll. I Färbung sichtbar.

Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht Ergebnisse Immunhistochemie

Pat.	Kollagen				MMP			IL1RA	iNOS	AS02	Neg.- Kontrollen
	I	II	III	VI	1	3	8				
M1	+	-/(+)	++	++	+	++	++	-	++	++	-
M2	+	-/(+)	++	++	+	++	+	-	+	++	-
M3	+	-/(+)	++	++	+	++	++	-	++	++	-
M4	+	-/(+)	++	+	+	++	++	+	++	++	-
M5	++	-/(+)	++	++	+	++	++	-	++	++	-
M6	+	-/(+)	++	++	+	++	++	+	++	++	-
K1	+	++									-

+ : positiv
++ : deutlich positiv

	(+) : Kernfärbung
	- : negativ

3.3 Besiedlung der Trägermaterialien

3.3.1 Besiedlungserfolg/HE-Färbung

Nach der Kulturzeit in Gewebekulturflaschen und –platten wurden die Zellen auf die verschiedenen Vliese übersiedelt, d.h. jeweils pro Patient auf 2x PLLA, 2x LG9010, 2x Pelvicol und 2x CMI, um an zwei Zeitpunkten den Erfolg beurteilen zu können.

3.3.1.1 Lichtmikroskop

Durch die grobgewebte Struktur der Polymere (PLLA, LG9010) war es möglich, bereits unter dem Durch-Lichtmikroskop die Zelladhäsion und –verteilung zu beurteilen. Die dichte Struktur von Pelvicol und CMI erlaubte dies nicht.

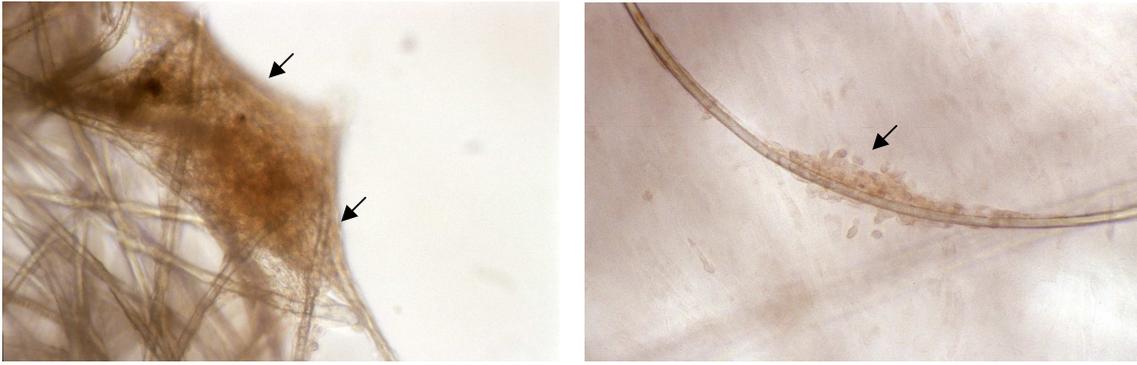


Abbildung 21: PLLA Tag 15, Zellhaufen am Polymerrand (li.), einzelne Faser mit Zellhaufen (re.)

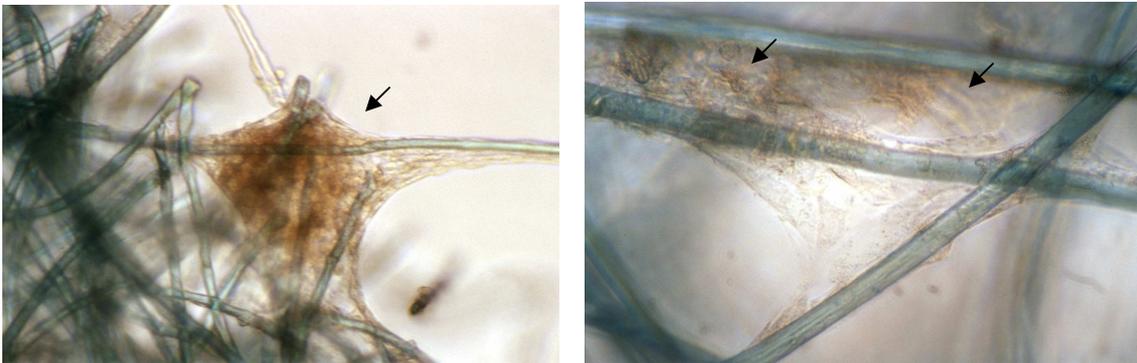


Abbildung 22: LG9010 Tag 15, Zellhaufen am Polymerrand (li., 10 x Objektiv), Polymerzentrum (re., 25 x Objektiv)

Unmittelbar nach Besiedlung der Polymere stellte man eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Vlies fest.

Bereits an Tag 15 war zu erkennen, dass die Zellen an den einzelnen Fasern des Polymers entlang wuchsen und somit jede Faser von einer Art Zellmantel umgeben war.

Insbesondere am äußeren Rand gab es eine Tendenz zur Bildung von größeren Zellhaufen (s. Abb. 21,22).

Die Überbrückung der Spalte zwischen zwei Fasern durch Zellen war nur vereinzelt, meist im Bereich größerer Zellhaufen zu beobachten.

Ergebnisse

3.3.1.2 HE-Färbung

Mit Hilfe der HE-Färbung war es möglich weitere Aussagen über Zellverteilung und –dichte zu treffen, insbesondere auch für Pelvicol und CMI. Die Beurteilung wurde von einer weiteren, unabhängigen Person wiederholt und verglichen. Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse in der Übersicht:

Tabelle 7: Übersicht Ergebnisse HE-Färbung

Patient	Vlies	Tag	Zelldichte	Änderung Zelldichte	Gleichm. Verteilung	Zentripetale Einwanderung
M2	PLLA	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	LG9010	15	+	+	+	++
		30	++		++	++
	Pelvicol	15	+	-	+	-
		30	+		++	+
	CMI	15	-	-	-	-
		30	-		-	-
M3	PLLA	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	LG9010	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	Pelvicol	15	+	+	++	-
		30	++		++	+
	CMI	15	-	-	-	-
		30	-		-	-
M4	PLLA	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	LG9010	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	Pelvicol	15	+	+	++	-
		30	++		++	+
	CMI	15	-	-	-	-
		30	-		-	-

Ergebnisse

Patient	Vlies	Tag	Zelldichte	Änderung Zelldichte	Gleichm. Verteilung	Zentripetale Einwanderung
M5	PLLA	15	+	+	+	++
		30	++		+	++
	LG9010	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	Pelvicol	15	+	+	+	+
		30	++		+	+
	CMI	15	-	-	-	-
		30	-		-	-
M6	PLLA	15	+	+	+	++
		30	++		+	++
	LG9010	15	+	-	+	++
		30	+		+	++
	Pelvicol	15	+	+	+	-
		30	++		+	+
	CMI	15	-	-	-	-
		30	-		-	-
- keine Zellen + < 10 Zellen/Gesichtsfeld ++ >10 Zellen/Gesichtsfeld (10xObjektiv)				- gleich + erhöht	- keine Zellen + gleichm. verteilt/einzelter Schnitt ++ gleichm. verteilt/alle Schnitte	- neg. + leicht ++ komplett

Die HE-Färbung zeigte eine deutliche Zellansiedlung auf PLLA-, LG9010- und Pelvicol-Vliesen. Auf CMI-Präparaten waren keine Zellen nachweisbar.

Eine Verdichtung der Zellhaufen von Tag 15 auf Tag 30 war nur andeutungsweise zu erkennen. Diese beschränkte sich vorwiegend auf Pelvicol-Vliese (Abb. 24,25), bei Pat. M5 und M6 waren auch PLLA-Vliese betroffen.

Ergebnisse

Die Verteilung der Zellen über die Oberfläche der Vliese war gleichmäßig, insbesondere bei den Polymeren gab es aber die Tendenz, größere Zellhaufen auszubilden.

Die Einwanderung der Zellen in Richtung Vlies-Zentrum hat bei den Polymeren bereits ab Tag 15 komplett stattgefunden, auf Pelvicol-Vliesen fand jedoch erst am Tag 30 eine nachweisbare Einwanderung in tiefere Schichten statt.

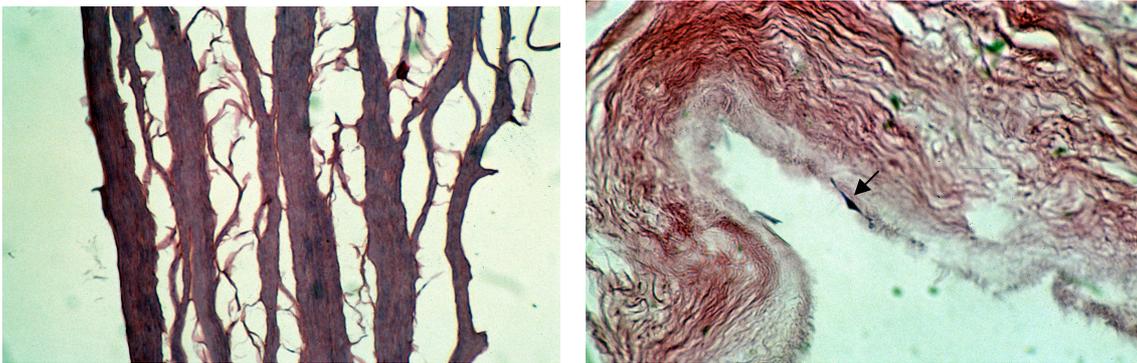


Abbildung 23: HE-Färbung: CMI (li.) am Tag 30 ohne erkennbare Zellen; Pelvicol-Pore (re.) am Tag 15

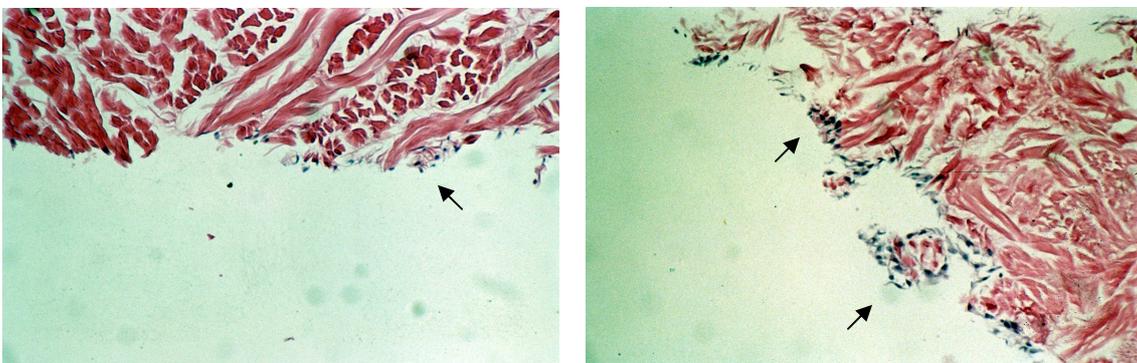


Abbildung 24: HE-Färbung: Pelvicol am Tag 15 (li.) und am Tag 30 (re.) mit Zunahme der Zelldichte



Abbildung 25: HE-Färbung: LG9010 am Tag 15

3.3.2 Alzianblau-Färbung

Mit Hilfe der Alzianblau-Färbung wurden saure Mukopolysaccharide nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente ein Paraffinschnitt eines Gelenkknorpels.

Tabelle 8: Übersicht Ergebnisse Alzianblau-Färbung

Patient	Vlies	Tag	Alzianblau
M2	PLLA	15	+
		30	-
	LG9010	15	+
		30	+
	Pelvicol	15	+
		30	+
M3	PLLA	15	-
		30	-
	LG9010	15	-
		30	-
	Pelvicol	15	+
		30	+

Ergebnisse

M4	PLLA	15	+
		30	-
	LG9010	15	+
		30	-
	Pelvicol	15	++
		30	-
M5	PLLA	15	-
		30	-
	LG9010	15	-
		30	-
	Pelvicol	15	+
		30	+
M6	PLLA	15	-
		30	-
	LG9010	15	-
		30	-
	Pelvicol	15	+
		30	+
- neg. + leicht pos. ++ deutlich pos.			

Während die sich die Pelvicol-Präparate schwach aber dennoch geschlossen positiv darstellten, fiel das Ergebnis bei den Polymeren weniger einheitlich aus. Den Polymeren gemeinsam ist, das jeweils nur sehr vereinzelt saure Mukopolysaccharide nachweisbar waren.

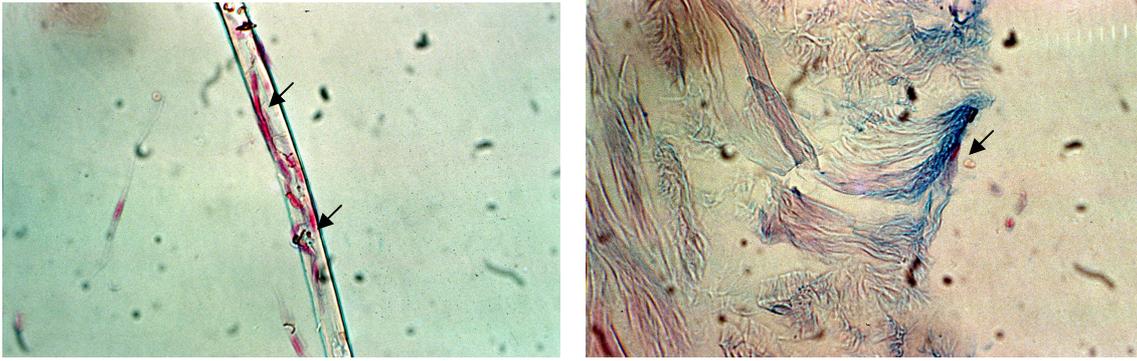


Abbildung 26: Alzianblau-Färbung (Paraffinschnitt): LG9010-Faser mit rot angefärbten Kernen (li.), hier ohne erkennbare Blaufärbung; Pelvicol (re.) mit deutlicher Blaufärbung

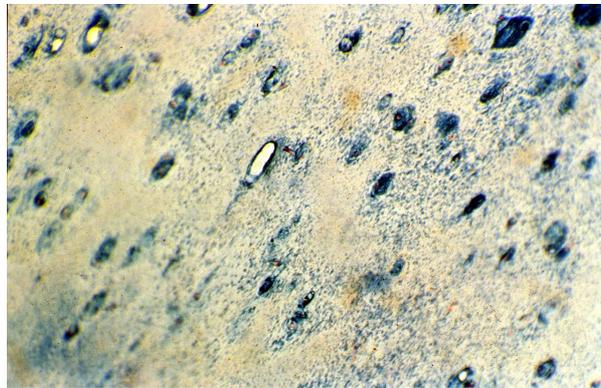


Abbildung 27: Alzianblaufärbung Knorpel, Blaufärbung im Bereich der Territorien

3.3.3 Immunhistochemie am Paraffinschnitt

Um die Syntheseleistung der Zellen im dreidimensionalen Verbund nach 15 und nach 30 Tagen zu charakterisieren, wurden die Vliese im Paraffinschnitt immunhistochemisch gefärbt. Hierbei war auch der Vergleich zu der Immunhistochemie an der in-vitro-Zellkultur interessant, da diese den Status der Zellen vor der Übersiedlung beschreibt.

Es wurden Antikörper gegen Kollagen I, II, III und VI sowie gegen MMP 1, 3, 8 verwendet. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers 0,1% BSA-Lösung aufgetragen. Für in-vitro-Zellen und Paraffinschnitte wurden Antikörper der jeweils gleichen Chargen verwendet.

Ergebnisse

Auf die Färbung von CMI-Präparaten wurde aufgrund der fehlenden Zellen verzichtet.

Als Positivkontrolle für Koll. I-III dienten Paraffinschnitte von Gelenkknorpeln.

Tabelle 9: Übersicht Ergebnisse Immunhistochemie

Patient	Vlies	Tag	Kollagen				MMP			Neg
			I	II	III	VI	1	3	8	
M2	PLLA	15	-	-	-	++	++	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	LG9010	15	-	-	-	++	++	++	+	-
		30	-	++	-	++	++	++	++	-
	Pelvicol	15	+	-	-	++	++	++	++	-
		30	+	-	-	++	++	++	+	-
M3	PLLA	15	-	-	-	++	++	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	LG9010	15	-	-	-	++	++	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	Pelvicol	15	++	-	-	++	++	++	+	-
		30	++	-	-	++	++	++	+	-
M4	PLLA	15	-	-	++	++	++	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	LG9010	15	-	-	+	++	+	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	Pelvicol	15	++	+	+	++	++	++	+	-
		30	++	-	-	++	++	++	+	-
M5	PLLA	15	-	-	-	++	+	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	LG9010	15	-	-	+	++	++	++	+	-
		30	-	-	-	++	++	++	+	-
	Pelvicol	15	+	-	+	++	++	++	+	-
		30	+	-	+	++	++	++	+	-

Ergebnisse

M6	PLLA	15	-	-	-	++	++	++	-	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	LG9010	15	-	-	-	++	++	++	+	-
		30	-	-	-	++	++	++	-	-
	Pelvicol	15	-	-	-	++	+	++	+	-
		30	++	+	-	++	++	++	+	-
- neg. + leicht pos. ++ deutlich pos.										

Das Färbeergebnis für Koll. I war positiv bei Zellen auf Pelvicol-Vliesen, lediglich bei Pat. M6 zeigte sich nach 15 Tagen ein negatives Ergebnis. Auf den Polymeren konnte kein Koll. I nachgewiesen werden (Abb. 29).

Koll. II war nur bei 3 Samples nachzuweisen. Pat. M2 LG9010 Tag 30, Pat. M4 Pelvicol Tag 15 und Pat. M6 Pelvicol Tag 30 (Abb. 30).

Inkonstanter waren die Ergebnisse für Koll. III. Bei Pat. M4 ergab sich eine Rotfärbung für alle Materialien am Tag 15, welche am Tag 30 nicht mehr zu beobachten war. Ähnliches gilt für Pat. M5 mit Ausnahme des PLLA-Vlieses.

Durchweg positiv war die Immunhistochemie für Koll. VI, MMP 1 (Abb. 31,32) und MMP 3.

MMP 8 war auf Pelvicol stets nachzuweisen, sowie auf LG9010 Vliesen der Patienten M2, M5, und M6.

Die jeweils mitgeführte Positivkontrolle für Koll. I, II, III war ohne Ausnahme deutlich positiv. Kollagenfärbungen auf Pelvicolvliesen ohne Zellansiedlungen waren negativ.

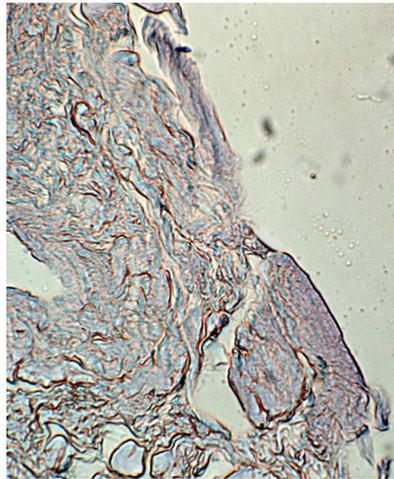


Abbildung 28: Pelvicol-Vlies ohne Zellen nach immunohistochemischer Färbung mit Koll. I Antikörper

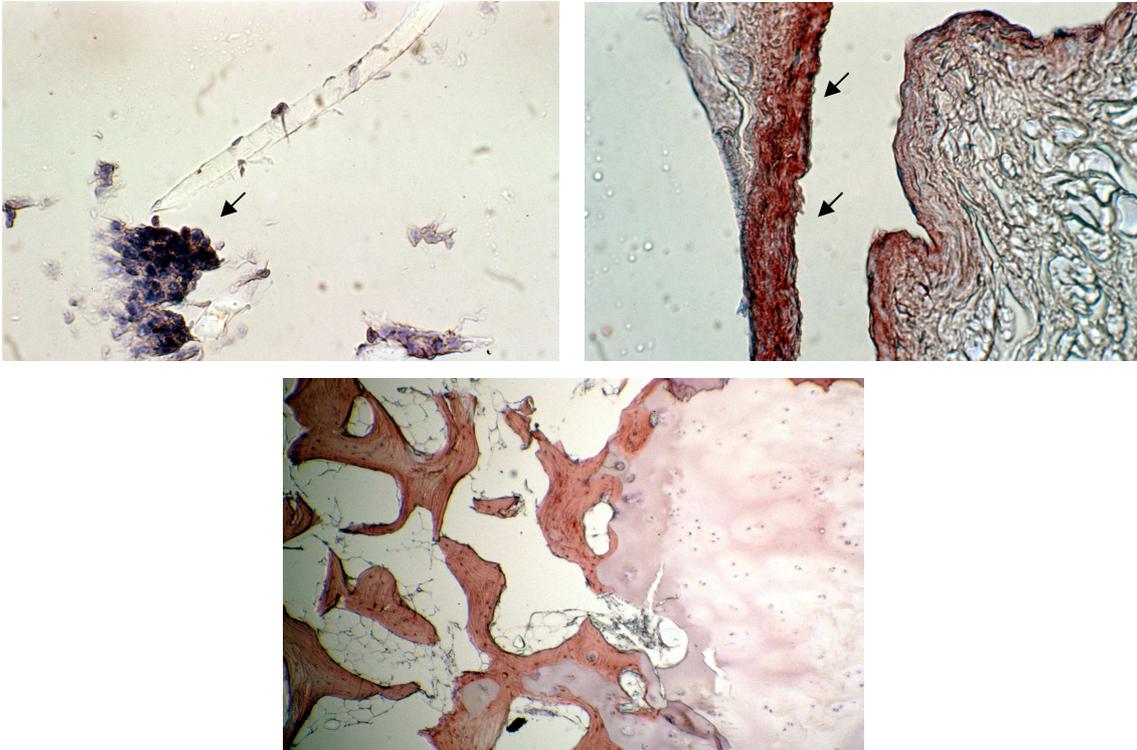


Abbildung 29: Koll. I: LG9010 (Tag 30, li.) negativ, Pelvicol-Pore (Tag 30, re.) positiv, Knorpel (unten) im knöchernen Bereich positiv

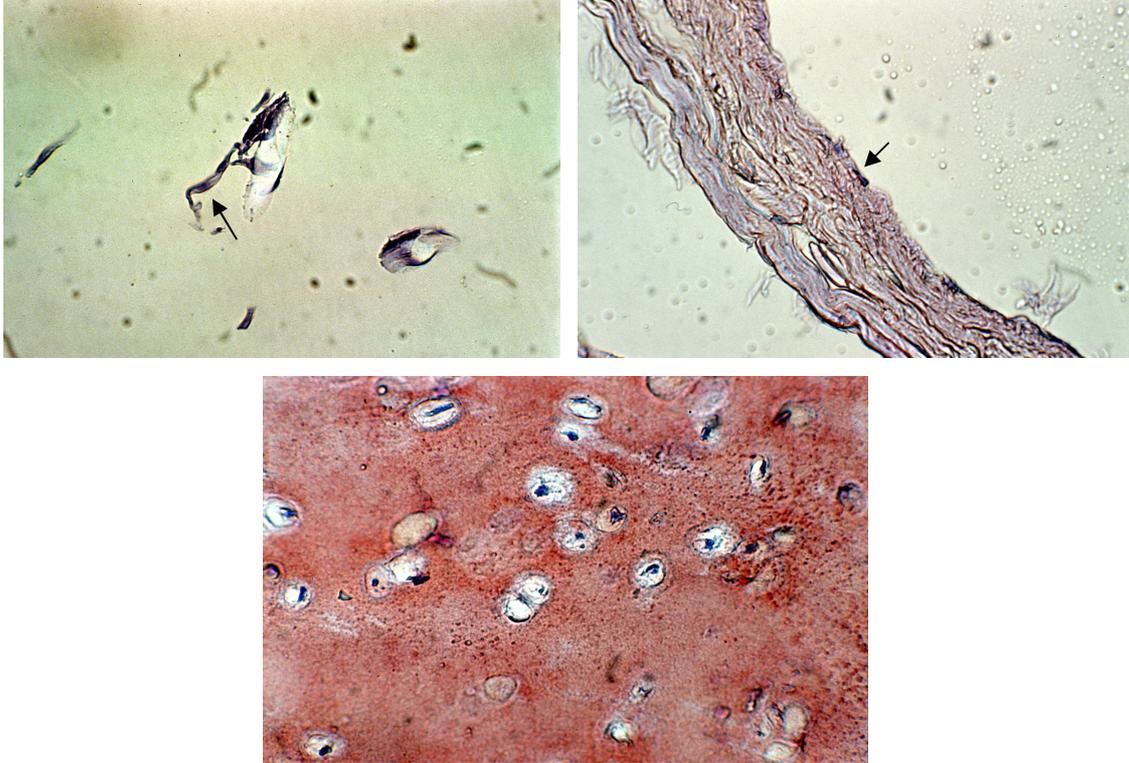


Abbildung 30: Koll. II: LG9010 (Tag 15, li.) und Pelvicol (Tag 15, re.), jeweils negativ; Knorpel (unten) in der Matrix deutlich positiv

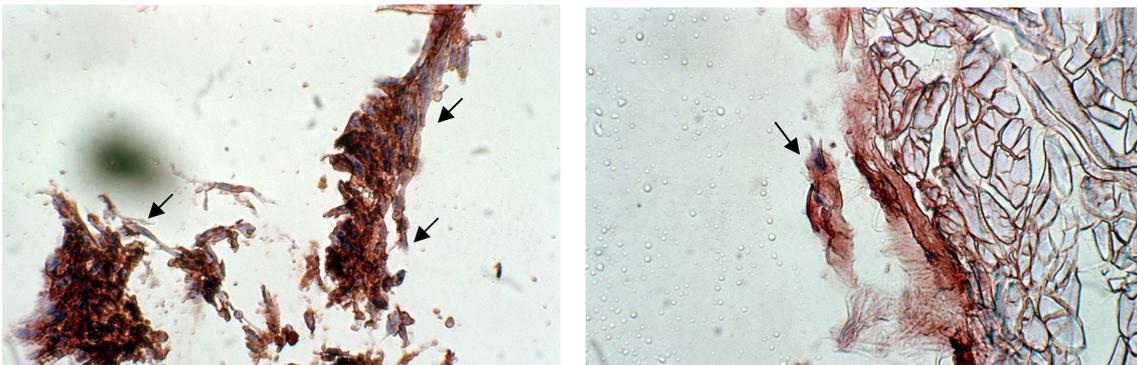


Abbildung 31: Koll. VI: PLLA (Tag 15, li.) und Pelvicol (Tag 15, re.) jeweils positiv

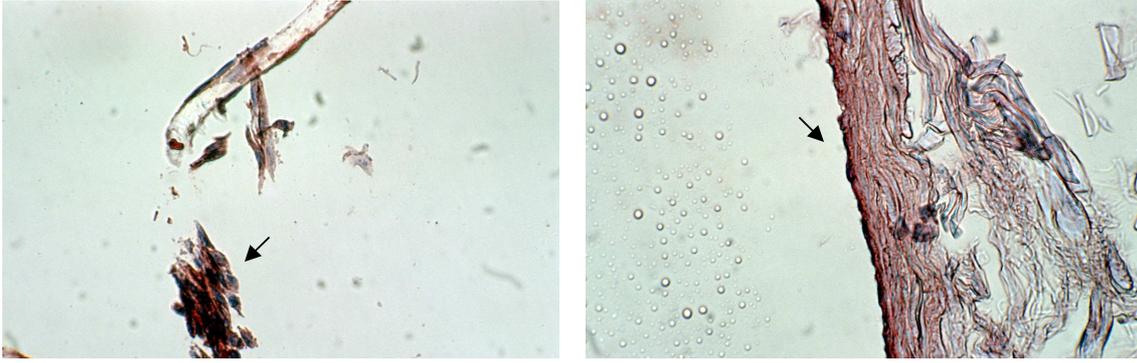


Abbildung 32: MMP1: PLLA (Tag 30, li.) positiv, Pelvicol (Tag 30, re.) positiv

4 Diskussion

Hauptziel dieser Studie war es, die Eignung humaner Meniskuszellen für die Übersiedlung auf eine Auswahl von Trägermaterialien zu überprüfen. Die einzelnen Teilschritte bzw. –ergebnisse erforderten stets eine genaue Analyse und Diskussion bereits während der Studie, da es eine Vielzahl von Variablen zu bedenken galt.

Im Folgenden werden daher die Ergebnisse noch einmal kurz zusammengefasst, mit denen anderer Autoren verglichen und diskutiert.

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellzahl

Nach durchschnittlich 47 Tagen wurden die Zellen abgeerntet und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt, um eine genaue Aufteilung der Zellen für die weiteren Bestimmungen zu erreichen.

Durch die jeweils gleich lange Brutzeit der Zellen der verschiedenen Patienten und die ähnliche Größe der zu Grunde liegenden Menisci M1-M5 wurden bei der Zellzählung auch jeweils vergleichbare Zellzahlen ermittelt. Die erhöhte Zellzahl bei Patient M6 ist durch den vergleichsweise großen Meniskus des Patienten zu begründen.

Es zeigte sich, dass genügend Zellmaterial/Patient für die weiteren Schritte (IHC, PCR, Trägermaterialien) zur Verfügung stand.

Es bleibt zu bedenken, die Inkubationszeit in den Zellkulturträgern zu verkürzen, da die lichtmikroskopische Beobachtung schon nach einem Zeitraum von 4-5 Wochen einen annähernd dichten Zellrasen in den Zellkulturträgern ergab und mit wachsender Kulturzeit die Gefahr der Dedifferenzierung von Zellen steigt, insbesondere in Monolayer-Kulturen (vgl. Stokes et al. 2001)¹³.

4.1.2 RNA-Quantifizierung

Nach erfolgter Aufteilung wurde die RNA der Zellen, die mittels RT-PCR untersucht werden sollten, extrahiert und anschließend quantifiziert. Dabei wurde auch die Reinheit der RNA bestimmt, da diese auf das Ergebnis der PCR großen Einfluss hat.

Die RNA-Menge war dabei von Patient zu Patient relativ variabel, war aber stets deutlich ausreichend für die Umschreibung in cDNA und die Durchführungen der erforderlichen PCR-Durchgänge.

Die Variabilität der RNA-Menge ist nur teilweise durch die unterschiedliche Zellzahl zu begründen. Entscheidend ist wahrscheinlich das äußerst sensible Verfahren der RNA-Extraktion an sich, dass durch viele Zwischenschritte auch viele Quellen für zufällige und systematische Fehler enthält. Die bis auf eine Ausnahme gewährleistete Reinheit der RNA war allerdings die wichtigste Voraussetzung für gut zu interpretierende und verlässliche PCR-Ergebnisse.

4.2 Zellcharakterisierung

4.2.1 RT-PCR

Parallel zur Übersiedlung der Meniskuszellen auf die Trägermaterialien wurde der Zellpool jedes Patienten mittels RT-PCR charakterisiert. Dabei wurde jeweils auch eine Kultur von Chondrozyten zum Vergleich mitgeführt. Bestimmt wurde die Expression der Gene für Kollagen I und II, MMP 1, 2, 3 und 8, Interleukin 1, 6 und 18, BMP 2, TGF β_1 und iNOS.

Die mRNA des für Faserknorpel typischen Kollagen I konnte bei allen Meniskuszellkulturen ähnlich stark ausgeprägt wie bei Chondrozyten nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß schwach ausgeprägte Kollagen II Banden bei den Meniskuszellkulturen standen im Gegensatz zu einer deutlichen Bande bei den Chondrozyten. Nakata et al. (2001) kamen für diese Gene auf die gleichen Ergebnisse, wenn auch mit anderen Primer-

Sequenzen¹⁴. Auch Sweigart et al. berichteten bereits, dass Kollagen I einen Anteil von über 90% am Gesamtkollagen des Meniskus innehaben¹⁵. Bei der Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche für den enzymatischen Abbau von Kollagenen und anderen Matrixkomponenten zuständig sind, konnten keine Unterschiede zwischen Meniskuszellen und Chondrozyten erkannt werden.

Interleukine haben eine wichtige Rolle im Immunsystem und als Signalstoffe zwischen Zellen generell. Sie wirken pro-proliferativ u.a. auf Fibroblasten und induzieren die Sekretion weiterer Zytokine¹⁶. Sowohl für Interleukin 6 als auch für Interleukin 18 waren die Banden relativ einheitlich und sind ein Indikator für den Stress, dem die Zellen durch Zellkultur und Zellernte ausgesetzt waren. Die schwächere Bande bei Patient M1 für Interleukin 6 könnte durch die zügigere Weiterverarbeitung nach der Zellernte bedingt sein, da diese Zellkultur nicht auf Trägermaterialien übersiedelt wurde. Interleukin 1 konnte im Gegensatz zu den Meniskuszellen bei den Chondrozyten nicht nachgewiesen werden, womöglich verursacht durch die besonderen Bedingungen der Zellkultur (GMP-Bedingungen, autologes Serum). Die Meniskuszellen waren im Gegensatz dazu mit Rinderserum expandiert worden. Ghosh et al. beobachtete 1987, dass Fibrochondrozyten auf Mediatoren wie IL-1 mit einer Synthesesteigerung von Kollagenasen und Proteoglykanasen reagieren, wodurch die ausreichende Matrixbildung, auch in den Trägermaterialien, behindert werden könnte¹⁷.

Die Banden für BMP 2 und TGF β_1 , die jeweils regulatorisch auf Wachstum und Differenzierung von Zellen wirken, waren in Ihrer Intensität gleich stark und stellen damit eine Art Stellrad dar, an welchem für die Optimierung der Zellkultur gedreht werden könnte. BMP 2 hat seine Bedeutung in der Formation von Knochen- und Knorpelgewebe und in der Differenzierung der Zellen und ist damit auch für die Differenzierung der Zellen im Tissue engineering wichtig¹⁸. Auch TGF β_1 ist für Differenzierung und Proliferation wichtig, Rieck et al. beobachteten einen pro-proliferativen Effekt auch schon auf Hornhautendothel in vitro¹⁹. Tanaka et al. beobachteten auf TGF β_1 Stimulus hin eine erhöhte Proteoglykansynthese bei Fibrochondrozyten²⁰.

Das Gen für die induzierbare NO-Synthetase, welche über die NO-Synthese stimulierend auf die lösliche Guanylatcyclase und damit die intrazelluläre Signalverarbeitung wirkt, konnte sowohl bei Meniskuszellen als auch etwas deutlicher bei der Chondrozytenkultur nachgewiesen werden. Die Rolle der iNOS wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert, Mendes et al. (2002) schreiben ihr beispielsweise eine Arthritis provozierende Rolle zu²¹. Ob daher der Effekt für die Zellkultur förderlich ist, wäre noch zu klären.

Einschränkend muss aber betont werden, dass die RT-PCR, wie sie hier eingesetzt wurde eine qualitative Methode darstellt. Man kann daher kaum quantitative Aussagen zur mRNA-Menge machen. Quantitative Aussagen erfordern andere Methoden, z.B Northern Blot oder Light-Cycler-PCR.

Auch sagt die PCR nichts über die Translation und damit über die tatsächliche Syntheseleistung der Zelle auf Proteinebene aus, da man durch die PCR nur die mRNA erfasst. Aussagen darüber können z.B. mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen getroffen werden, die Syntheseprodukte der Zelle an sich nachweisen.

4.2.2 Immunhistochemie an der in-vitro Zellkultur

Neben der RT-PCR wurden die Zellen der Primärkultur auch immunhistochemisch charakterisiert, um das tatsächliche Synthesemuster auf Proteinebene zu erfassen. Es wurden Antikörper gegen die Kollagene I, II, III und VI, die Matrix-Metalloproteinasen 1, 3 und 8, iNOS, Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL1-RA) und den Fibroblastenmarker AS02 verwendet.

Das Meniskus-typische Kollagen I, das in Basalmembranen vorkommende Kollagen III und das ubiquitär vorhandene Kollagen VI konnte dabei in allen Fällen nachgewiesen werden. Eine reine Kernfärbung ergab sich beim Antikörper gegen Kollagen II. Da man im Zellkern jedoch kein Kollagen erwartet, muss man davon ausgehen, dass hier eine Kreuzreaktivität zwischen Kollagen II Antikörper und Strukturen des Zellkerns vorliegt. Immunhistochemische Färbungen von Menisci ex vivo (Roberts et al., 2002) erbrachten vergleichbare Ergebnisse, was dieses Kollagensynthesemuster

betrifft²². Bei Chondrozyten beobachtete man im Vergleich typischerweise eine mäßige Kollagen I Anfärbung bei deutlicher Kollagen II Anfärbung, was auch für das Funktionieren insbesondere des Koll. II-Antikörpers spricht.

Die immunhistochemischen Ergebnisse für die Matrix-Metalloproteinasen bestätigten die Ergebnisse der RT-PCR, alle untersuchten MMPs konnten nachgewiesen werden.

Bei dem Fibroblastenmarker AS02 sah man stets ein deutlich positives Ergebnis. Ghadially et al. zeigten bereits 1983, dass ein Meniskus sowohl Chondrozyten- als auch Fibroblasten-ähnliche Zellen enthält, auch Nakata et al. bestätigten dies²³.

Auch der Nachweis von iNOS in der Immunhistochemie deckte sich mit der iNOS-Bande der RT-PCR und deutet auf das funktionierende second-messenger-System Guanylatcyclase hin. Zur Bedeutung s. 4.2.1

Wechselnde Ergebnisse waren bei der IL1-RA-Färbung zu verbuchen. Dies könnte entweder auf eine inkonstante Synthese der Zellen, insbesondere durch die Zellkultur, bedingt sein, oder aber auf die allgemeinen Probleme der Immunhistochemie zurückzuführen sein. Durch Blockade des IL1-Rezeptors wird die Wirkung des proinflammatorischen aber auch pro-proliferativen IL1 gebremst und verhindert damit eine überschießende Entzündungsreaktion.

Die Immunhistochemie ist ein äußerst störanfälliges Verfahren. Neben Kreuzreaktivität und starker Hintergrundfärbung, die durch unzureichend inaktivierte Enzyme und unspezifische Bindungsstellen verursacht werden kann, ist vor allem auch die häufige „Maskierung“ des Zielproteins für eine erschwerte Interpretation verantwortlich. Insbesondere Formalin hat die potentielle Eigenschaft, durch Denaturierung von Proteinen das Antigen für den Antikörper unsichtbar zu machen. Daher sind negative aber auch positive Ergebnisse immer zu hinterfragen. Durch Kontrollversuche, wie Anfärbungen mit nicht-bindenden Primärantikörpern (Isotyp-Kontrolle) oder Färbungen anderer Gewebe können unter optimalen Bedingungen aber recht sichere Aussage getroffen werden.

Der Vergleich mit Ergebnissen von RT-PCR und Immunhistochemie anderer Autoren lässt darauf schliessen, dass die angezüchteten Zellen zu diesem

Zeitpunkt nicht Opfer von Dedifferenzierung geworden sind und sie damit noch immer als Fibrochondrozyten bezeichnet werden dürfen.

4.3 Besiedlung der Trägermaterialien

4.3.1 Einbettung in Paraffin

Ein kritischer Punkt in der Evaluation des Besiedlungserfolgs lag bereits in der Entscheidung, welches Einbett- und Schneidverfahren für das vorhandene Material das beste sei, um möglichst Artefakt-arme Ergebnisse zu erzielen.

Als Einbettmedium stand der Kunststoff Glycolmetakrylat zur Auswahl, sowie das verwendete Paraffin.

In einer Studie (Loeb sack et al., 1998), die Paraffin und Glykolmetakrylat anhand Ihres Effektes auf PLLA-Trägermaterialien verglich, wurde deutlich, dass es bei der Paraffinmethode im Gegensatz zur GMA-Methode nicht nur zu Strukturverlust der Vliese per se, sondern auch zu partiellem Zellverlust kam. Zelluläre Strukturen sowie die Interaktion zwischen Zelle und Material waren schwer zu interpretieren²⁴. Als Ursache hierfür sehen die Autoren weniger das Paraffin an sich als eher die Aufbereitung und Fixierung mit Formalin. Die mit GMA eingebetteten Proben waren lediglich in der Peripherie von einer Auflockerung der Struktur betroffen.

Da die GMA-Einbettung, insbesondere das Aushärten des Kunststoffes, jedoch einige Monate in Anspruch nimmt, sich die histologischen und immunhistochemischen Färbungen schwierig gestalten können und nicht zuletzt laut Firma Kulzer (Reutlingen) obengenannte Artefakte in praxi auch bei GMA erwarten lassen, fiel die Wahl auf Paraffin²⁵.

Tatsächlich beobachtete man bei der Anfertigung der Schnitte, dass die Proben zumindest makroskopisch unversehrt waren, mikroskopisch zeigte sich insbesondere beim CMI eine aufgelockerte Struktur, die ein Hinweis auf ein bereits beobachtetes Quellungsverhalten sein könnte. Auch bei PLLA/LG9010

ist ein partieller Verlust von Material und damit auch von Zellen, bedingt durch die grobgewebte Struktur, nicht auszuschließen.

4.3.2 Besiedlungserfolg/HE-Färbung

Das Verhalten der Zellen bezüglich Ansiedlung, Verteilung und Zelldichte zu verschiedenen Zeitpunkten sollte mit der HE-Färbung sichtbar gemacht werden. In der HE-Färbung färbt den Zellkern blau, das Zytoplasma rötlich.

4.3.2.1 Lichtmikroskop

Erste Anhaltspunkte lieferte bereits die lichtmikroskopische Beobachtung der polymeren Trägermaterialien PLLA und LG9010. Die Besiedlungsmethode führte durchaus zu einer initial homogenen Verteilung der Zellen. Weiter konnte beobachtet werden, dass die Zellen eine gewisse Affinität zu den Polymerfasern hatten und diese dadurch mantelartig umwuchsen.

Man konnte jedoch auch feststellen, dass die Zellen nur sehr vereinzelt in der Lage waren, die Freiräume zwischen benachbarten Polymerfasern zu überbrücken und damit ein kompaktes Gewebe zu bilden. Als Grund drängt sich hier die sehr grobgewebte Struktur der Polymere auf, die durch die zu großen Lücken eine solche Überspannung erschwerte.

Daraus erklärte sich schließlich auch rückwirkend die Schwierigkeit, die Zellen überhaupt erst in ausreichender Dichte auf das Material aufbringen zu können, da viele Zellen durch die Lücken hindurchfallen. Entscheidend waren zusammenfassend die übermäßig großen Faserabstände bzw. der geringe Faseranteil (Porenvolumen 94-95%) im Vergleich zu der weitaus geringeren Größe der Zellen.

Die Tendenz zur Bildung größerer Zellhaufen in der Peripherie lässt sich damit erklären, dass die Zell-Medium-Suspension bereits beim Aufbringen auf das Vlies vereinzelt größere Zellhaufen enthält und diese durch das weitere Procedere bereits zu Beginn an den Rand des Vlieses gespült werden. Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe von Bioreaktoren verhindern, die durch

Bewegung der Flüssigkeit nicht nur Ernährung sondern zu Beginn auch Zellverteilung günstig beeinflussen können³².

4.3.2.2 HE-Färbung

Qualitativ und quantitativ aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich Zellverteilung und -dichte auf den Vliesen lieferte jedoch die HE-Färbung von Paraffinschnitten der Vliese. Nun konnten auch Aussagen über die Materialien getroffen werden, die in vitro mit Zellkultur-Lichtmikroskop nicht zu beurteilen waren. Von jedem Paraffinblock wurde dabei eine durchgehende Schnittfolge von je 5µm angefertigt und jeweils jeder zehnte Schnitt angefärbt.

Adhärenente Zellen konnten auf den Polymeren PLLA und LG9010 sowie auf dem Kollagen-Vlies Pelvicol nachgewiesen werden. Insbesondere die Eignung von Pelvicol-ähnlichen Fabrikaten wurde bereits nachgewiesen, Harding beschreibt die Migration von Fibrochondrozyten auf die Oberfläche eines verwandten Vlieses nach 48 h²⁶. Auch Polymere werden bereits im Tissue engineering verwendet. Beispielsweise im Bereich der Kieferchirurgie haben sie bereits erste klinische Erfolge zu verbuchen²⁷

Lediglich auf dem kollagenen Meniskusersatzimplantat CMI konnte keine erfolgreiche Zellbesiedlung gezeigt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass entweder das Material an sich oder die Methodik der Zellbesiedlung für dieses Material für Tissue engineering mit Fibrochondrozyten ungeeignet ist. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen, die Stone et al. 1997 in einer klinischen Studie mit einem CMI-Fabrikat ähnlicher Struktur machten. In dieser Studie zeigte sich ausgedehnte Zellbesiedlung und typgerechte Kollagensynthese, es handelte sich jedoch um eine in vivo Studie, d.h. die CMIs wurden nach Implantation im menschlichen Kniegelenk beurteilt²⁸.

Bei dem Vergleich der angefärbten Schnitte von Tag 15 und Tag 30 war eine Verdichtung der Zellpopulation auf den Trägermaterialien nur sehr wage zu erkennen, am ehesten war dies auf den Pelvicol-Vliesen nachzuweisen. Beweiskräftige Aussagen sind allerdings schwer zu treffen, da dieses Ergebnis mit der HE-Färbung schwer zu objektivieren ist. Aussagekräftigere Ergebnisse würden hier z.B. Antikörperfärbungen gegen proliferationspezifische Antigene liefern.

Bezüglich der Zellverteilung auf den Trägermaterialien, die durch Vergleich des Zellbilds auf den regelmäßig angefärbten Schnitten beurteilt wurde, zeigte sich sowohl bei den Polymer- als auch bei den Pelvicol-Vliesen grundsätzlich homogene Zellansiedlungen auf allen Schnitten. Einzelne Zellhaufen, die auch schon lichtmikroskopisch *in vitro* erkennbar waren, gab es erwartungsgemäß auch hier. Wie bereits unter 4.3.2.1 erwähnt, lassen sich diese wohl auf Zellklümpchen in der Zell-Medium-Suspension zurückführen, in der die Vliese inkubiert worden waren.

Die intensive dreidimensionale Einwanderung der Zellen bis ins Scaffoldzentrum, wie sie praktisch sofort bei den Polymer-Vliesen zu sehen war, wird hier durch die grobgewebte Struktur von PLLA und LG9010 begünstigt. Die Zellen hatten somit schon zum Zeitpunkt t_0 der Besiedlung die Möglichkeit, sich auch in Richtung Vlieszentrum zu verteilen. Das verwendete Pelvicol bietet diese Möglichkeit nicht bzw. nur in Gestalt von einzelnen Poren, die die Einwanderung der Zellen erleichtern, sodass sich die Zellen mithilfe eigener Enzyme in das Vlies hineinarbeiten müssen.

4.3.3 Alzianblaufärbung am Paraffinschnitt

Mit Hilfe der Alzianblaufärbung sollten saure Mukopolysaccharide nachgewiesen werden. Diese Färbemethode wird typischerweise an Chondrozyten bzw. Knorpelgeweben angewendet, sollte aber in unserem Fall Aufschluss über die Syntheseleistung der Fibrochondrozyten auf den Trägermaterialien gewähren.

Auf Pelvicolpräparaten waren zwar schwach aber zumindest zuverlässig saure Mukopolysaccharide nachzuweisen. Auf Polymerpräparaten dagegen waren nur äußerst vereinzelt positive Ergebnisse zu entdecken. Da die Kontrollfärbung auf Gelenkknorpelschnitten deutlich positiv ausfiel, kann man davon ausgehen, dass die Färbemethodik korrekt durchgeführt wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zellen auf den Polymeren entweder keine sauren Mukopolysaccharide produziert haben, oder diese durch das Paraffin-

Processing aus der grobmaschigen Struktur der Polymere herausgewaschen worden sind.

Eindeutig ist aber das positive Ergebnis auf Pelvicolpräparaten, welches einen ersten Hinweis darauf liefert, dass die Zellen auf dem Kollagenvlies eine günstigere Umgebung nicht nur für Proliferation sondern auch für Synthese vorfinden dürften.

Zur Färbemethodik an ist zu sagen, dass die Färbelösung sehr schwer herzustellen ist, da der Farbstoff die Eigenschaft hat, nur sehr schwer bzw. nur unter besonderen Vorraussetzungen in Lösung zu gehen. Grundsätzlich ist also auch diese Tatsache bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten. Die positiven Färb-Ergebnisse bei den Positivkontrollen bestätigen die Ergebnisse in ihrer Aussagekraft jedoch.

4.3.4 Immunhistochemie am Paraffinschnitt

Neben dem eigentlichen Übersiedlungserfolg wurde nun das Expressionsmuster der Zellen in den Trägermaterialien nach 15 und nach 30 Tagen überprüft. Dazu diente analog zu der Analyse der Zellen in vitro die Anfärbung mit Hilfe immunhistochemischer Methoden. Überprüft wurde die Expression der Kollagene Typ I, II, III und VI sowie der Matrix-Metalloproteinasen 1, 3 und 8.

Das für Fibrochondrozyten charakteristische Kollagen I konnte auf sämtlichen Pelvicolvliesen nachgewiesen werden und bestätigt wiederum die guten Ergebnisse, die mit Pelvicol erzielt wurden. Besonders deutliche Anfärbungen zeigten sich v.a. im Bereich der Zellen, die sich in den Vliesporen angesiedelt hatten. Die Befürchtung, dass sich das Pelvicolvlies, das aus Kollagen besteht, komplett anfärbt und somit eine Interpretation erschwert, wurde durch negative Kollagenfärbungen des Vlieses ohne Zellbesiedlung ausgeräumt werden.

Die Rotfärbungen beschränkten sich streng auf die von Zellen besiedelten Bereiche. Im Gegensatz dazu und zu den Ergebnissen der Zellen in vitro konnte Kollagen I auf den Polymeren PLLA und LG9010 nicht nachgewiesen werden, weder intra- noch extrazellulär. Das lässt darauf schließen, dass die

Zellen im Polymer die Fähigkeit zur Synthese von Koll. I verloren haben. Ob die Polymere per se zu einer Syntheserepression führen können sei dahingestellt. Bei kollagenen Trägermaterialien wurden allerdings bereits Einflüsse auf das Synthesemuster nachgewiesen, wenn auch teilweise chargen-abhängig³⁵.

Das eher Chondrozyten- und Fibroblasten-typische Kollagen II war bis auf drei Ausnahmen nicht nachweisbar, analog zu den Ergebnissen der Zellen in vitro. Da bei Dedifferenzierung von Zellen zu Fibroblasten die Synthese von Koll. II eher zunimmt, könnte dies gegen Dedifferenzierung der Zellen in den Trägermaterialien sprechen. Wieder muss aber auch die Möglichkeit der induzierten Kollagensynthese-Repression miteinbezogen werden.

Die Färbeergebnisse für Kollagen III waren, wenn auch innerhalb der jeweiligen Patienten M2-M6 einheitlich, insgesamt eher unterschiedlich, was eine Interpretation erschwert. Hier divergiert das Ergebnis aber scheinbar von dem der Zellfärbung in vitro, was zumindest auf eine beginnende Mutation der Zellen hinweisen könnte.

Anders sah dies bei Koll. VI, MMP1 und MMP3 aus, hier beobachtete man sowohl bei den Pelvicol- als auch den Polymervliesen ein geschlossen positives Färbeergebnis, das mit dem Ergebnis der Zellfärbung übereinstimmte.

Auch die positiven MMP8-Färbungen auf den Pelvicolvliesen weisen auf eine erfolgreiche Ansiedlung der Zellen hin und stimmen wieder mit den Ergebnissen der Zell-Immunhistochemie überein. Etwas unzuverlässiger stellte sich die MMP8-Synthese der Zellen auf den Polymeren dar, nur bei drei von fünf Patienten war die interstitielle Kollagenase MMP8 nachweisbar. Da die Zellen jedes Patienten vor der Übersiedlung auf die Vliese gepoolt worden waren, kann man davon ausgehen, dass auch auf MMP8 ein repressiver Effekt der Polymere besteht.

Dass Zellen unter sich ändernden Kulturbedingungen ihr Expressionsmuster ändern können, wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Dies kann reversibel sein. Stokes et al. beschrieb dies 2001 anhand von Chondrozyten, die nach dem Wechsel von Monolayerkultur auf die dreidimensionale Kultur (polyHEMA) ihren Chondrozyten-spezifischen Phänotyp wiedererlangten¹³. Auch biochemisch lässt sich dieser Vorgang beeinflussen. Grunder et al. zeigte

dies, indem er einer 3D-Chondrozytenkultur BMP2 hinzugegeben hat, wonach die Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Behandlung eine gesteigerte Kollagen II Expression aufwiesen. Dieser Effekt wurde allerdings nicht in der Monolayerkultur beobachtet²⁹.

Bei der Immunhistochemie am Paraffinschnitt sind die allgemeinen Probleme immunhistochemischer Färbungen nicht minder relevant wie an der Zellkultur (s. 4.2.2), hinzu kommt noch, dass das bei der Fixierung der Trägermaterialien verwendete Formalin eine zusätzliche Störwirkung auf die Ergebnisse haben kann. Formalin führt zur Denaturierung von Proteinen durch Änderung des isoelektrischen Punktes und kann damit auch zu Maskierungen von Antigenen führen. Durch Anfertigung von entsprechenden Negativ- und Positivkontrollen wurde dieser Fehler aber minimiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Zellen besteht theoretisch in der RT-PCR. Hierzu müssten die Zellen allerdings aus dem Verbund gelöst werden, was durch Zellstress die Ergebnisse verfälschen würde.

4.4 Conclusio

Das vorrangige Ziel dieser Studie war es, die Eignung von Fibrochondrozyten für das Tissue engineering in Abhängigkeit von vier verschiedenen Trägermaterialien grundsätzlich zu überprüfen und eine Methode zur Übersiedlung der Zellen auf diese Trägermaterialien zu entwickeln. Parallel zum Übersiedlungszeitpunkt wurden die Zellen mittels RT-PCR und Immunhistochemie charakterisiert, um die Ausgangsbedingungen festzustellen. Der Besiedlungserfolg wurde mit Hilfe von HE-Färbungen, Alzianblaufärbungen und immunhistochemischen Färbungen überprüft.

Die Charakterisierung der Zellen ergab, dass man bei den vorliegenden Zellen nach der Vorkulturzeit von Fibrochondrozyten sprechen kann und lieferte den Ausgangswert für die späteren Färbungen.

Die gewählte Methode der Übersiedlung, die Trägermaterialien in einer hochkonzentrierten Zell-Mediumsuspension zu inkubieren, erwies sich in der

lichtmikroskopischen Beurteilung und der HE-Färbung als erfolgreich und effizient, da die Zell-Verteilung gleichmäßig und die initiale Zelldichte durchaus hoch war. Vorversuche, die Zellen auf die Trägermaterialien aufzupipettieren, wie es z.B. Hsu et al. mit Rattenchondrozyten auf Polymervliesen durchgeführt haben, erwiesen sich als nicht praktikabel³⁰. Eine Ausnahme stellte das verwendete CMI dar, auf dem, zumindest mit dieser Methode, keine Zellansiedlung erreicht werden konnte.

Die HE-Färbung an Tag 30 nach Übersiedlung konnte nur Anhaltspunkte liefern, was die Proliferation der Zellen angeht. Eine erhöhte Zelldichte im Vergleich zu Tag 15 konnte allerdings lediglich auf Pelvicol Schnitten beobachtet werden. Insgesamt sind die Abstände zwischen den Fasern bei den Polymeren PLLA und LG9010 zu groß, so dass durch erschwerte Brückenbildung der Proliferation der Zellen Grenzen gesetzt sind.

Auch die Analyse der Synthese der Zellen innerhalb der Trägermaterialien führt zu der Annahme, dass das Kollagen-Vlies Pelvicol besser für das Tissue engineering mit Fibrochondrozyten geeignet ist als die Polymere. Diese Vermutung stützt sich vor allem auf die nicht nachweisbare Synthese von Kollagen I sowie von sauren Mukopolysacchariden der Zellen in den Polymeren.

Zusammenfassend wurden die besten Ergebnisse mit Pelvicol erzielt. Verbesserungsmöglichkeiten bestehen in der Wahl des Zeitpunktes der Übersiedlung sowie der Anregung der Zellen zu Proliferation und Synthese, beispielsweise mit geeigneten Bioreaktoren. Aber auch in der Wahl des geeigneten Trägermaterials stehen noch vielfältige Optionen zur Verfügung, mit Fibrin und Polyhydroxyethylmetacrylat (polyHEMA) seien nur zwei genannt^{2,13}. Insbesondere bei Fibrin hat sich eine deutliche Affinität der Zellen zum Material gezeigt. Problematisch ist dagegen aber die schwierige Verarbeitung des Materials in mehreren Zwischenschritten bei der Ansiedlung der Zellen.

Bezüglich des optimalen Zeitpunktes für die Besiedlung der Trägermaterialien besteht die Möglichkeit, die Vorkulturzeit auf z.B. sieben Tage zu verkürzen¹⁴, oder auf eine Vorkulturzeit völlig zu verzichten, wie es Vunjak et al. und Ameer et al. mit Chondrozyten durchgeführt haben^{31,32}. Ersteres geht allerdings mit

Diskussion

einer geringeren Ausgangszellzahl einher, was parallele Charakterisierungen einschränken würde.

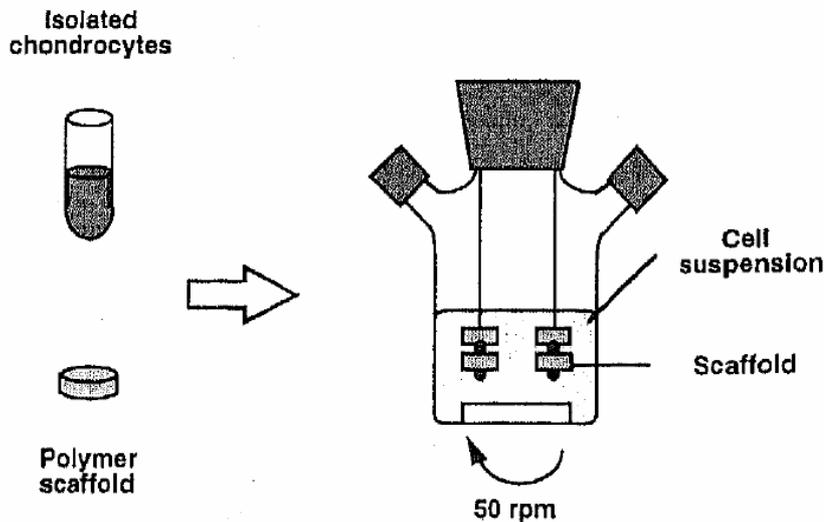


Abbildung 33: Spinnerflask, nach Vunjak et al. 1998

Vorteile verspricht man sich auch von Bioreaktoren unterschiedlichster Art, die z.B. durch stetige Bewegung des Zellmediums für eine bessere Versorgung aber auch zu einer direkten mechanische Stimulation der Zellen führen soll, hier seien beispielhaft sogenannte Spinnerflasks genannt^{32,33} (Abb. 33). Andere Möglichkeiten bestehen darin, die Zellen Ultraschall niedriger Intensität ($30\text{mW}/\text{cm}^2$) auszusetzen, wie es Korstjens et al. erfolgreich mit Knochenzellen durchgeführt haben³⁴.

Die verwendeten Charakterisierungsmethoden (PCR, Immunhistochemie) und insbesondere die Indikatoren (Kollagene, MMP, Interleukine) haben sich als sinnvoll herausgestellt. Die Methoden wurden soweit etabliert, dass künftige Charakterisierungen mit den verwendeten Indikatoren schnell und sicher durchgeführt werden können. Von besonderer Bedeutung war allerdings das Kollagensynthesemuster, auf das auch künftig besonderes Augenmerk gelegt werden sollte, da hier die Hauptunterschiede zu anderen Zellspezies bestehen.

5 Zusammenfassung

Der Meniskus stellt eine Art bewegliche Gelenkpfanne dar, der Rotationsbewegungen im menschlichen Kniegelenk bei Erhaltung der Bewegungsstabilität bei Beuge- und Streckbewegungen ermöglicht. Darüber hinaus dient der Meniskus nicht unwesentlich zur Stossabsorbktion. Da das Kniegelenk allerdings zeitlebens einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt ist, sind in der klinischen Orthopädie sowohl degenerativ als auch traumatisch bedingte Schäden des Meniskus von hoher Relevanz und begünstigen das Entstehen einer Gonarthrose.

Bedingt durch die nur in der Meniskus-Peripherie vorhandene Vaskularisierung sind der endogenen Heilung von Meniskusschäden Grenzen gesetzt. Umso wichtiger ist also die Entwicklung neuer Verfahren zur Therapie von Meniskusschäden, wie beispielsweise das Tissue engineering mit dem Fernziel, ein autologes Meniskusersatzimplantat herstellen zu können. Gegenstand dieses Projektes war die Erprobung verschiedener Materialien, die den Meniskuszellen, den sogenannten Fibrochondrozyten, in Zukunft als Trägermaterial (Scaffold) dienen, sowie die Entwicklung eines Verfahrens für die Übersiedlung der Zellen auf diesen Materialien.

Es standen das Kollagenvlies Pelvicol (CR Bard inc.), das kollagene Meniskusersatzimplantat CMI (Sulzer) sowie die polymeren Vliese PLLA und LG9010 (ITV Denkendorf) zur Verfügung. Der Besiedlungserfolg per se wurde mit Hilfe HE-gefärbter Paraffinschnitte der Materialien zum Zeitpunkt $t_{15 \text{ Tage}}$ und $t_{30 \text{ Tage}}$ nach Übersiedlung evaluiert. Parallel wurden zum Zeitpunkt $t_{0 \text{ Tage}}$, $t_{15 \text{ Tage}}$ und $t_{30 \text{ Tage}}$ nach Übersiedlung Zellcharakterisierungen mittels RT-PCR ($t_{0 \text{ Tage}}$: Koll. I und II, MMP 1, 2, 3 und 8, IL-1, -6, -18, TGF β_1 , BMP2, iNOS) und Immunhistochemie ($t_{0 \text{ Tage}}$: Koll. I, II, III und VI, MMP 1, 3 und 8, AS02, iNOS, IL-1RA; $t_{15 \text{ Tage}}$, $t_{30 \text{ Tage}}$: Koll. I, II, III und VI, MMP 1, 3 und 8) sowie eine Alzianblaufärbung ($t_{15 \text{ Tage}}$, $t_{30 \text{ Tage}}$ nach Übersiedlung) durchgeführt.

Die Zellen benötigten durchschnittlich 46,83 Tage, um in den Zellkulturflaschen und -platten einen geschlossenen Zellrasen zu bilden, damit ausreichend

Zellen zur Verfügung standen. Die Ergebnisse der Zellcharakterisierung zum Zeitpunkt $t_{0 \text{ Tage}}$ wiesen jedoch auch nach der Vorkultur keine Zeichen für Dedifferenzierung/Entartung auf, insbesondere das Expressionsmuster von Kollagen I und II war typisch für Fibrochondrozyten. Lichtmikroskopische Beobachtungen der Polymervliese in vitro direkt nach der Übersiedlung zeigten, dass die Methode, die Trägermaterialien für 3h in eine hochkonzentrierte Zellmediumsuspension einzulegen, effektiv war. Die in Vorversuchen angewandte Methode, die Trägermaterialien tropfenweise mit Zellmediumsuspension zu beschicken, erwies sich dabei sowohl in der Durchführung als auch im Ergebnis als ungeeignet. Die HE-Färbungen der Paraffinschnitte bestätigte dies sowohl bezüglich der Zelldichte als auch – verteilung auf den Trägermaterialien. Die Ausnahme stellte CMI dar, auf dem keine Zellen nachgewiesen werden konnten. Von $t_{15 \text{ Tage}}$ auf $t_{30 \text{ Tage}}$ konnte jedoch lediglich bei den Pelvicol-Vliesen eine geringe Erhöhung der Zelldichte beobachtet werden, auf den Polymer-Vliesen war dies praktisch nicht der Fall. Auch bezüglich des Synthesemusters der Zellen schien Pelvicol als Trägermaterial überlegen zu sein. Verwiesen sei hier vor allem wieder auf die Koll. I Synthese der Zellen auf Pelvicol-Vliesen im Gegensatz zu Zellen auf Polymer-Vliesen, aber auch die Ergebnisse der Alzianblaufärbung, durch die nur auf Pelvicol-Präparaten saure Mukopolysaccharide nachgewiesen werden konnten.

Weitere Studien werden sich zum einen mit der Optimierung sowohl des Übersiedlungszeitpunktes als auch der Kulturbedingungen, d.h. der Testung von Bioreaktoren, beschäftigen müssen, um Proliferations- und Syntheseverhalten der Zellen positiv zu beeinflussen. Zum anderen gilt es die verschiedenen Optionen, was Trägermaterialien angeht, zu überprüfen. Diese müssen schließlich in Zukunft auch den extremen mechanischen Ansprüchen im menschlichen Kniegelenk, im Fall von biodegradierbaren Materialien zumindest für eine gewisse Zeit, genügen.

Zusammenfassung

Die Studie hat gezeigt, dass sich Meniskuszellen zellkulturell züchten und charakterisieren lassen. Die Meniskuszellen lassen sich auf die Materialien PLLA, LG9010 und Pelvicol übersiedeln, auf CMI wachsen sie nicht an.

Aufgrund Zellvermehrung/-verteilung und Synthesemuster der Zellen war Pelvicol das geeignetste Material.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH (1996): Histologie. Springer Verlag
- ² Arnoczky S: Building a meniscus. Clin Orthop 367S (1999); 244-253
- ³ McDevitt C, Webber R: The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. Clin Orthop 252 (1990); 8-18
- ⁴ Miller R, McDevitt C: Thrombospondin in ligament, meniscus and intervertebral disc. Acta 1115 (1991); 85
- ⁵ Lippert H (2000): Lehrbuch Anatomie. Urban & Fischer
- ⁶ Ahmed AM, In Mow VC Arnoczky SP, Jackson DW: The load-bearing role of the knee menisci. Knee meniscus: basic and clinical foundations (1992); 59-73
- ⁷ Webber RJ: In vitro culture of rabbit meniscal tissue. Clin Orthop 252 (1990); 114-120
- ⁸ Shinoka T, Ma PX, Shum-Tin D: Tissue engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in lamb model. Circulation 94 (1996); 164-168
- ⁹ Stone KR, Rodkey WG, Webber RJ, McKinney L, Steadman JR: Future directions. Collagen based prostheses for meniscal regeneration. Clin Orthop 131 (1990); 279-287
- ¹⁰ Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL: Biomaterialien – humane Toleranz und Integration. Chirurg 70 (1999); 847-857
- ¹¹ Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J: Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis Cartilage 10(1) (2002); 62-70
- ¹² Bourne JA (1983): Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden. DAKO Corporation; S.24
- ¹³ Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA: Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. Biochem J 360(Pt 2) (2001); 461-470

- ¹⁴ Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, Horibe S, Tada K, Ochi T, Yoshikawa H: Human meniscus cell. *Clin Orthop* 391S (2001); 208-218
- ¹⁵ Sweigart M, Athanasiou K: Review toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue engineering* 2 (2001); 111-129
- ¹⁶ Löffler G, Petrides PE(1997): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer
- ¹⁷ Ghosh P, Taylor TK: The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop* 224 (1987); 52-64
- ¹⁸ www.medicinenet.com, Zugriff am 27.1.2005
- ¹⁹ Rieck P, Sabatier P, Hartmann C, Pleyer U, Renard G, Pouliquen Y: Effekt von FGF-2+TGF β auf die Wundheilung des organkultivierten Hornhautendothels. *Augenkl. Charité & Virchow Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin, 13353 Berlin; Banque Francaise des Yeux und Universitäts-Augenkl. des Hotel Dieu, 1, F-75004 Paris*
- ²⁰ Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y: Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 7 (1999); 75
- ²¹ Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC: Role of mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases on IL-1-Induced NF-kappaB activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes. *Nitric Oxide* 6(1) (2002); 35-44
- ²² Roberts S, McCall I, Darby A, Menage J, Evans H, Harrison P, Richardson J: Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther* 5 (2003); 60-73
- ²³ Ghadially F, Lalonde J, Wedge J: Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 136 (1983); 773-791
- ²⁴ Loeb sack A, Halberstadt C, Holder W, Culberson C, Beiler R, Greene K, Roland W, Burg K: The development of an embedding technique for polylactide sponges. *J Biomed Mater Res* 48 (1999); 504-510
- ²⁵ Firma Kulzer (Reutlingen), persönliches Gespräch

- ²⁶ Harding ML: Human meniscal chondrocyte culture and matrix infiltration with specific reference to meniscal generation. *Knee* 10 (2002); 43-45
- ²⁷ Suhonen JT, Meyer BJA: Polylactid acid root replica in ridge maintenance after loss of vertically fractured incisor. *Endodont Dent Trauma* 12 (1996); 155
- ²⁸ Stone KR, Steadman JR, Rodkey WG, Li ST: Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. *J Bone Joint Surg* 79A (1997); 1770-1777
- ²⁹ Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK: Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 12(7) (2004); 559-567
- ³⁰ Hsu SH, Tsai CL, Tang CM: Evaluation of cellular affinity and compatibility to biodegradable polyesters and type-II collagen modified scaffolds using immortalized rat chondrocytes. *Artificial Organs* 26(7) (2002); 647-658
- ³¹ Ameer GA, Mahmood TA, Langer R: A biodegradable composite scaffold for cell transplantation. *J Orthop* 20 (2002); 16-19
- ³² Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE: Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotech Prog* 14 (1998); 193-202
- ³³ Sittlinger M, Buija J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 15 (1994); 451-456
- ³⁴ Korstjens CM, Nolte PA, Burger EH, Albers GHR, Semeins CM, Aartman IHA, Goei SW, Klein-Nulend J: Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity ultrasound. A histomorphometric in vitro study. *J Orthop* 22 (2004); 495-500
- ³⁵ Gaissmaier C, Fritz J, Benz K, Stoop R, Schewe B, Weise K: Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zu biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. *SFA Arthroskopie aktuell* 16 (2003)

7 Danksagung

Diese Arbeit entstand unter Leitung von Herrn PD. Dr. Maximilian Rudert, ltd. Oberarzt der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen. Für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung, Geduld und konstruktive Kritik möchte ich ihm herzlich danken.

Großen Dank schulde ich auch Herrn PD. Dr. Wilhelm Aicher, dem Leiter des osteologischen Labors, der mir mit seiner großen Kompetenz und Erfahrung die praktische Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichte und es verstand, meinen Ehrgeiz zu wecken.

Dank gilt weiterhin:

Herrn Dr. Burkhard Lembeck für die Herstellung der Kontakte und die Betreuung der Arbeit

Herrn Dr. Maik Hoberg für die fachkundigen Tipps und den großen Einsatz

Frau Anita Hack für ihre großartige mentale, praktische und strategische Unterstützung

Frau Elisabeth Kienzle für Ihre fast grenzenlose Hilfsbereitschaft

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des OP-Traktes und der Pathologie für Geduld, Zuverlässigkeit und Hilfe

Frau Dr. Dorothea Alexander und Frau Tanja Abruzzese für wertvolle Tipps und Aushilfe mit Labormaterialien

Meiner Familie, Yvonne und meinen Freunden

8 Curriculum vitae

Name: Sebastian Reese

Geburtsdatum: 17.12. 1979

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: Verheiratet mit Yvonne Reese, geb. Brauner am 22.3. 1983

Eltern: Dr. med. Lutz Reese, geb. am 9.4. 1937
Barbara Reese, geb. Eggers, geb. am 4.7. 1941

Schulische 1986 – 1990: Pestalozzi-Schule Gerlingen

Bildung: 1990 – 1999: Gymnasium Gerlingen
1999: Abitur

Ausbildung: 1999 – 2000: Krankenpflegeausbildung an der
Krankenpflegeschule des Marienhospitals Stuttgart

Studium: SS 2000 – WS 2001/2002: Studium Humanmedizin, Vorklinik
3/2002: Ärztliche Vorprüfung
SS 2002 – WS 2002/2003: Erster klinischer Studienabschnitt
3/2003: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
SS 2003 – vorraussichtl. SS 2005: Zweiter klinischer
Studienabschnitt
WS 2003/04: Beginn der Dissertation an der orthopädischen
Universitätsklinik Tübingen (PD Dr. Rudert, PD Dr. Aicher)
8/2005: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2006: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung