

4 Diskussion

4.1 Chondrogenes Potential equiner mesenchymaler Stammzellen (MSC)

In vergangenen Studien konnte das chondrogene Potential equiner MSC aus dem Knochenmark bereits unter folgenden Versuchsbedingungen aufgezeigt werden: Zum einen in Monolayer-Kulturen mit TGF- β 1 als Differenzierungsfaktor, zum anderen in einer dreidimensionalen Fibrinmatrix mit Insulin-like-growth-factor-1 als Differenzierungsfaktor (Worster et al., 2000; 2001).

Anders als in diesen vorangegangenen Studien, wurden in unserer Studie die MSC mittels Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten aus dem Knochenmark isoliert, was eine bessere Vorselektion der MSC ermöglichte.

Wir konnten zeigen, dass die so gewonnenen und bis zur zweiten Passage kultivierten equinen MSC sich unter verschiedenen Bedingungen entlang der chondrogenen Linie differenzieren: In hochdichten 3D-Kulturen konnten wir mittels der Differenzierungsfaktoren TGF- β 1, Hyaluronsäuren (Hylartil®, Ostenil®) und autologer Synovialflüssigkeit jeweils Chondrogenese induzieren, in Vlies-Kulturen gelang dies mittels TGF β -1 und autologer Synovialflüssigkeit.

4.2 Chondrogene Differenzierung in hochdichten 3D-Kulturen

Ähnlich der embryonalen Knorpelentwicklung, die mit Zellkondensationen einhergeht, schaffen hochdichte 3D-Kulturen gute Voraussetzungen für Interaktionen der differenzierenden Zellen mit ihrer Mikroumgebung (Solursh, 1991; Cancedda, 1995). Diese besteht im Wesentlichen aus anderen Zellen und der Extrazellulär-Matrix. Vorherige Studien haben die Wichtigkeit dieser Interaktionen für die Regulation der Chondrogenese in der embryonalen Entwicklung gezeigt (Maleski et al., 1996a; Toole, 1981; 1991; 2001). Hervorzuheben ist hierbei die Interaktion von Hyaluronsäure mit dem auch auf MSC exprimierten CD44-Rezeptor (Pittenger et al., 1999). Bei Chondrozyten ist inzwischen bekannt, dass es bei der Aktivierung mittels Hyaluronsäure via CD44-Rezeptor zu einer Erhöhung der TGF- β mRNA kommt (Ishida et al., 1997).

Das von uns gewählte Verfahren sieht zwei Schritte vor: Als erstes wurden die MSC für acht Stunden in Zellsuspension mit den jeweiligen Differenzierungsfaktor gehalten, um Interaktionen zwischen den Zellen und den Differenzierungsfaktoren zu fördern. In einem zweiten Schritt

wurden die MSC dann durch Zentrifugation zu hochdichten 3D-Kulturen geformt – wenn man so will, eine Simulation der embryonalen Zellkondensation.

In unserer Studie zeigte die Kontrollgruppe am Tag 26 keine Proteoglycansekretion und keine Kollagen Typ II Expression.

In vorangegangenen Studien haben verschiedene Mitglieder der TGF- β Superfamilie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren bereits an MSC verschiedener Spezies die Fähigkeit gezeigt in verschiedenen Kulturformen Chondrogenese zu induzieren (Johnstone et al., 1998; Mackay et al., 1998; Worster et al., 2000; 2001; Sekiya et al., 2001; Ringe et al., 2002).

In unserer Studie zeigte sich TGF- β 1 in den hochdichten 3D-Kulturen als effektivster Differenzierungsfaktor. Auch im embryonalen Knorpel wird TGF- β 1 reichlich gebildet und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der chondrogenen Transformation von primitiven mesenchymalen Zellkondensationen (Hall und Miyake, 1995).

In älteren Studien konnte schon gezeigt werden, dass Hyaluronsäure in Zellkulturen vom Mesenchym der Extremitäten-Anlagen (Stadium 24) die Zellaggregation fördert und Chondrogenese induziert (Kujawa und Caplan, 1986; Maleski et al., 1996b). In diesen Versuchen zeigte die chondrogene Differenzierung einen Zusammenhang mit dem Molekulargewicht und der Konzentration der Hyaluronsäure. Molekulargewichte zwischen $2 \cdot 10^5$ Da und $4 \cdot 10^5$ Da stellten sich als optimal heraus (Kujawa et al., 1986). Weiter wurde beschrieben, dass Molekulargewichte höher als $1 \cdot 10^6$ Da die Chondrogenese hemmten, da sie die Zellaggregation blockierten, die als Voraussetzung zur Differenzierung gesehen wurde. Auch Konzentrationen von über 5 mg/ml Hyaluronsäure wirkten sich negativ auf die Zellaggregation aus, während Konzentrationen um 0,1 mg/ml diese förderten (Maleski et al., 1996b). In unserer Studie evaluierten wir das chondrogene Potential zwei unterschiedlicher Hyaluronsäuren, die für *in vivo* Applikationen zugelassen sind: Ostenil® mit einem Molekulargewicht von $3 \cdot 10^6$ Da, zugelassen für Anwendungen am Menschen und Hylartil® mit einem Molekulargewicht von $2 \cdot 10^6$ Da, zugelassen für Anwendungen am Pferd. Für beide Hyaluronsäuren wurde eine Konzentration von 0,1 mg/ml gewählt. Unabhängig der hohen Molekulargewichte beider Hyaluronsäuren, zeigten beide das Potential Chondrogenese in hochdichten 3D-Kulturen equiner MSC zu induzieren. Dies lässt sich mit dem von uns gewählten Verfahren erklären, im zweiten Schritt, trotz der hohen Molekulargewichte, eine Zellaggregation durch Pelettierung zu erzwingen.

Nach 26 Tagen in Kultur waren die mit Hyaluronsäure induzierten Pellets kleiner als die mit TGF- β 1 stimulierten Pellets. Dies liegt an einer potentiell höheren Wachstumsrate der Zellen und an einer höheren Expression extrazellulärer Matrixmoleküle in den TGF- β 1-Kulturen. Dies stimmt auch mit Berichten überein, wonach TGF- β in hochdichten 3D-Kulturen humaner MSC zu einer deutlichen Zunahme an Größe und Gewicht führt (Sekiya et al., 2001).

Ein synergistischer Effekt von Hyaluronsäure und TGF- β 1 konnte nicht festgestellt werden. Es muss vermutet werden, dass Hyaluronsäure in Kombination mit TGF- β 1 potentiell die Wachstumsrate der Zellen hemmt, da die Pelletgröße dieser Ansätze kleiner ist als nur mit TGF- β 1 induzierte Pellets. Die Proteoglycansekretion im Verhältnis zur Pelletgröße als Indikator für die Produktion knorpelspezifischer extrazellulärer Matrix der Zellen ist jedoch in beiden besprochenen Gruppen etwa gleich.

Autologe Synovialflüssigkeit hat in vorhergehenden Studien das Potential gezeigt Chondrogenese in Perichondrium-Zellen *in vivo*, als auch *in vitro* zu induzieren (Skoog et al., 1990). Auch in einem Extremitäten-Anlagen Testsystem des Hühnchens (chicken limb bud assay) zur Untersuchung des Einflusses von Synovialflüssigkeit auf die embryonale Extremitäten-Entwicklung, konnte Chondrogenese verifiziert werden (Rodrigo et al., 1995).

Wir konnten zeigen, dass Synovialflüssigkeit ein bemerkenswertes Potential hat Chondrogenese in equinen MSC zu induzieren. Hyaluronsäure und Synovialflüssigkeit zeigen vergleichbare Proteoglycan-Expressionen im Verhältnis zum Gesamt-Pellet. Mit Synovialflüssigkeit induzierte Pellets sind jedoch deutlich größer als Pellets, die mit Hyaluronsäure induziert wurden. Dies weist darauf hin, dass Synovialflüssigkeit neben Hyaluronsäure noch weitere Faktoren beinhaltet, die die Entwicklung von Knorpel aus MSC fördern. Das Hormon Prolactin wurde als solch ein Faktor identifiziert, der Wachstum und chondrogene Differenzierung humaner MSC moduliert (Ogueta et al., 2002). Synovialflüssigkeit beinhaltet auch TGF- β 1, welches potentiell zu den größeren Pelletgrößen beigetragen hat (Okazaki et al., 2001).

4.3 Zellkultur und chondrogene Differenzierung im bioresorbierbaren Polymer-Vlies

In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass sich bioresorbierbare Polymer-Vliese als Trägermaterial für Knorpelzellen eignen (Freed et al., 1993; Sitterling et al., 1994; Erggelet et al., 2003). MSC zeigten bereits in Hyaluronsäure basierten Polymeren *in vitro* und *in vivo* die Fähigkeit zu

wachsen und Extrazellular-Matrix zu bilden (Radice et al., 1999). Bemerkenswert waren auch die *in vivo* Studien mit rein Hyaluronsäure basierten Schwämmen, in denen MSC sich chondrogen differenzierten (Gao et al., 2001; Solchaga et al., 2002). Dabei zeigte sich das die Hyaluronsäure basierten Schwämme auch ohne Zellbeladung *in vivo* die natürliche Regeneration im Sinne eines Neuaufbaus hyalinen Knorpels und dessen Integration im osteochondralen Defekt optimierte (Solchaga et al., 2002).

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass sich bioresorbierbare Polymer-Vliese (Ethisorb®) als Träger für equine MSC eignen. Allerdings war die Zelladhärenz in den Vliesen nur unter Zugabe autologer Synovialflüssigkeit wirklich befriedigend. Trotz Fibrinbeschichtung tendierten die Zellen in allen anderen Ansätzen dazu aus dem Vlies auszuwandern. Die viskösen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit sind potentiell der Zellretention im Vlies förderlich und auch für die gleichmäßige Verteilung der Zellen im Vlies verantwortlich. Dies führte auch zu einem im Vergleich homogeneren Aufbau der extrazellulären Matrix. Leider konnte von der Extrazellular-Matrix nur das Proteoglycan mittels Alcian-Blau Färbung verifiziert werden. Eine Proteoglycansekretion fand bei Induktion mittels Synovialflüssigkeit inselförmig im ganzen Vlies verteilt statt. Bei Induktion mittels TGF- β 1 jedoch nur schwach in den Randbereichen und stark in den Zellauflagerungen am Vlies.

Für weitere Versuche wäre eine wesentliche Erhöhung der Zelldichte im Vlies empfehlenswert, um die für die chondrogene Differenzierung wichtigen Zellinteraktionen stärker zu fördern und im Ergebnis eine stärkere und homogenere Matrixbildung erhoffen lässt.

4.4 Ausblick

Obwohl der in unseren Versuchen erzeugte Knorpel sicher noch nicht die hohe Qualität von nativem hyalinem Gelenkknorpel erreicht hat, sind die Ergebnisse viel versprechend.

Sie ermutigen zu weiteren Schritten in der Anwendung von MSC im Tissue Engineering bei osteochondralen Gelenkdefekten. Speziell da sich in dieser Studie die gesunde natürliche Umgebung im Gelenk als vorteilhaft für die chondrogene Differenzierung von MSC gezeigt hat.

Synovialflüssigkeit verdient weitere Untersuchungen ihrer Komponenten und deren Potential allein und in Kombinationen Chondrogenese zu induzieren.

Im Hinblick auf klinische Anwendungen MSC ist es wichtig zu berücksichtigen, dass der Großteil an Patienten mit Bedarf für regenerative Therapien des Gelenkes im fortgeschrittenen Alter ist und an chronischen degenerativen Gelenkerkrankungen leidet.

Von Interesse ist daher auch die Erforschung des Einflusses pathologischer Synovialflüssigkeit auf MSC. Von Mesenchymzellen der Extremitäten-Anlagen weiß man bereits, dass Synovialflüssigkeit aus chronisch verletzten Gelenken zu einer Inhibition der Chondrogenese führen kann (Skoog et al., 1990). Zu Prüfen wäre demnach, ob im Falle ähnlichen Verhaltens MSC, sich durch Zugabe von Hyaluronsäure zur pathologischen Synovialflüssigkeit ein chondrogener Effekt wieder herstellen ließe. *In vivo* wäre dies insbesondere im Sinne therapeutisch bereits angewandter intrartikulärer Hyaluronsäure-Injektionen ein interessanter Ansatz sowie im Hinblick auf eine aktuell laufende Studie mit in Hyaluronsäure suspendierten MSC, die dem kranken Gelenk injiziert werden (Osiris therapeutics, 2005a).

Im fortgeschrittenen Alter findet sich eine verminderte Anzahl isolierbarer MSC (Caplan, 1994). Zusätzlich zeigte sich bei Patienten mit fortgeschrittener Arthrose eine deutlich erniedrigte Proliferations- und Differenzierungskapazität MSC (Murphy et al., 2002). Studien zur Hypoimmunogenität MSC (Tse et al., 2003; Le Blanc et al. 2003) lassen jedoch hoffen, das sich durch den Einsatz allogener MSC die beschriebene Problematik lösen lässt.

Unsere Ergebnisse unterstützen auch die Bemühungen Hyaluronsäure basierte Biomaterialien als Träger für Knorpeltransplantate zu nutzen (Radice et al., 2000; Solchaga et al., 2000). Hyaluronsäure agiert hier als Differenzierungsfaktor und stellt zusätzlich eine Quelle zum Aufbau extrazellulärer Knorpelmatrix da, in der Hyaluronsäure eine der Hauptkomponenten ist.

Die hohe Festigkeit der MSC-Transplantate aus bioresorbierbarem Polymer-Vlies gilt es biomechanisch zu quantifizieren. Neben dem Einsatz im Gelenk wäre hier auch eine Applikation bei operativ zu versorgenden degenerativen Bandscheibenerkrankungen denkbar. Die Anfangs weichen faltbaren Transplantate ließen sich gut minimalinvasiv mikrochirurgisch platzieren. Aufgrund der Polymervliesstruktur würden sie dann aber relativ schnell eine hohe Festigkeit entwickeln.