

ne wurde mit Hämatoxylin (10 Min. bei RT) vorgenommen. Das abschließende Bläuen der Zellkerne erfolgte für 20 Min. unter fließendem Leitungswasser. Nach dem Entfernen der Kammern konnten die Objektträger mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex) eingebettet werden. Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden alle Proben mikroskopisch beurteilt und die Resultate fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Equine mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden mit Hilfe eines Percollgradienten der Dichte 1,077 g/ml aus Knochenmarkspiraten gewonnen. Knochenmarkszellen, hauptsächlich aus Erythrocyten und anderen nicht adhären wachsenden hämatopoetischen Zellen bestehend, wurden ausgesät. Am achten Tag wurden alle nicht adhären Zellen mittels eines Mediumwechsels entfernt. Zu diesem Zeitpunkt waren auf dem Boden der Kulturflaschen bereits fibroblastenartige Zellen sichtbar, die sich wirbelartig in großflächigen Zellclustern anordneten (Abb. 11: A). Dieser Phänotyp ist charakteristisch für MSC. Kultivierung, Passagierung und weitere Expandierung zeigten keine Verminderung der proliferativen Eigenschaften dieser Zellen (Abb. 11: B).

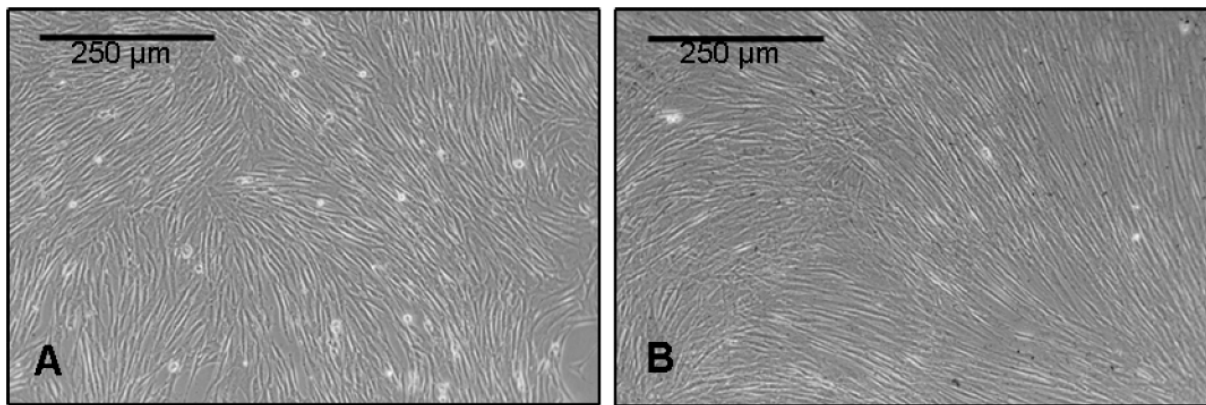


Abb. 11: Phasenkontrast-Photomikrographien equiner mesenchymaler Stammzellen (MSC) in Kulturflaschen. Aus Pferde-Knochenmark gewonnene Zellen wurden in Kultur gebracht und bestanden hauptsächlich aus runden Erythrocyten und nicht adhären wachsenden hämatopoetischen Zellen. (A) Am achten Tag haben sich equine MSC fibroblastischer Morphologie am Boden der Kulturflasche ausgebreitet, vermehrt und wirbelförmig angeordnet. (B) Subkultivierte equine MSC der zweiten Passage präsentierten sich weiter in stabiler fibroblastischer Morphologie und wurden für die Versuche der chondrogenen Differenzierung genutzt.

3.2 Chondrogene Differenzierung in hochdichten 3D-Kulturen (Pellet-Kulturen)

Der chondrogene Einfluss von TGF- β 1, der Hyaluronsäuren Hylartil® und Ostenil®, als auch von autologer Synovialflüssigkeit wurde untersucht. Dazu wurden equine MSC der zweiten Passage 26 Tage lang unter jeweiligen Zusatz der genannten Differenzierungsfaktoren in hochdichten 3D-Kulturen gehalten. Das Potential der MSC sich entlang der chondrogenen Linie zu differenzieren wurde durch Anfärbung der extrazellulären Proteoglycane der Knorpelmatrix mit Alcian-Blau bei einem pH von 2,5 und der immunohistochemischen Färbung des knorpelspezifischen Kollagens Typ II nachgewiesen. (Abb. 12) zeigt zum Vergleich die beschriebenen Färbemethoden beim nativen hyalinen Pferdeknorpel.

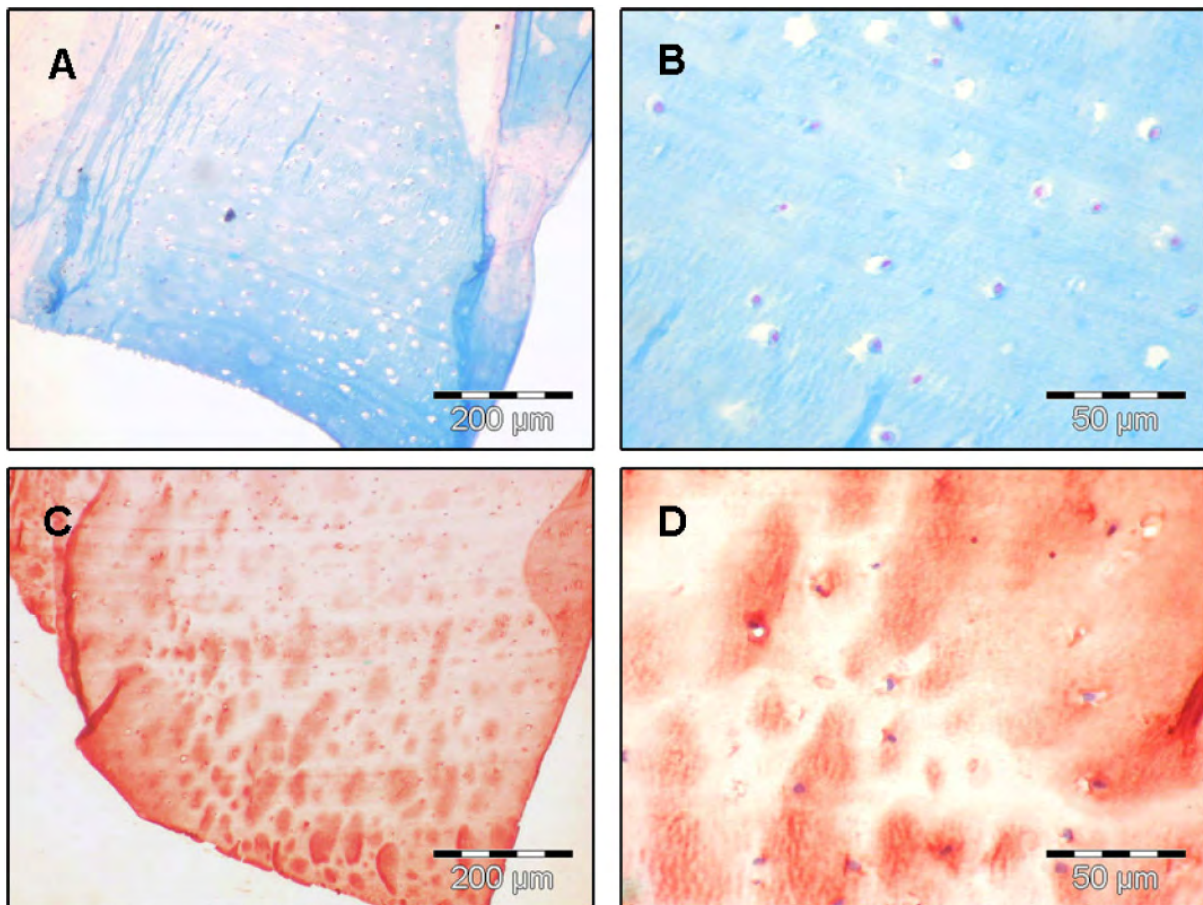


Abb. 12: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von nativem equinen Knorpel. (A-B) Eine deutlich positive Alcianblau-Färbung weist die Proteoglycane der Extrazellular-Matrix nach. (C-D) Die monoklonale Antikörper-Färbung für Kollagen Typ II ist auch positiv. Die unregelmäßigen Farbtintensitäten lassen sich durch die Maskierung der Kollagenfasern im nativen Knorpel erklären, die man mittels Hyaluronidasen- und Kollagenasenbehandlung vor dem Färben versucht zu beseitigen.

In allen induzierten hochdichten 3D-Kulturen wurden Proteoglycane und Kollagen Typ II nachgewiesen, nicht aber in den hochdichten 3D-Kulturen der Kontrollgruppe (Abb. 16, Abb 17, Abb. 18, Abb. 19). Proteoglycane und Kollagen Typ II waren in den meisten Pellets tendenziell mehr im Zentrum konzentriert während das bindegewebstypische Kollagen Typ I mehr in den Randbereichen der Pellets lokalisiert war (Abb. 13).

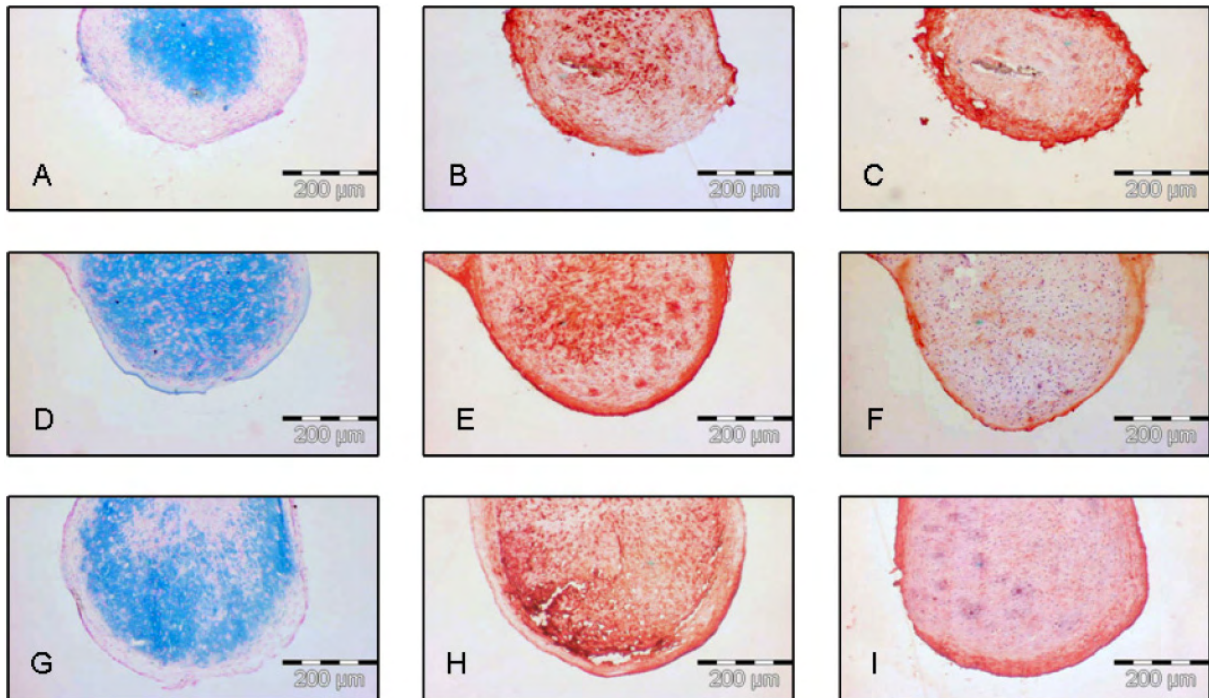


Abb. 13: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur. Exemplarische Übersicht zur Lokalisation von (A,D,G) Proteoglycanen, (B,E,H) Kollagen Typ II und (C,F,I) Kollagen Typ I mit den Differenzierungsfaktoren (ABC) Hyaluronsäure (Hylartil), (D,E,F) Hyaluronsäure (Hylartil) in Kombination mit TGF- β 1 und (G,H,I) Synovialflüssigkeit. An diesen Beispielen wird besonders deutlich, dass Proteoglycan und Kollagen Typ II tendenziell mehr im Zentrum konzentriert ist, während das bindegewebstypische Kollagen Typ I mehr in den Randbereichen der Pellets lokalisiert ist.

3.2.1 TGF- β 1 und Hyaluronsäuren als induzierende Faktoren der Chondrogenese

Im Vergleich zu den Kontroll-Pellets (Abb. 16: A, B), zeigten mit 10 ng/ml TGF- β 1 induzierte hochdichte 3D-Kulturen eine wesentlich höhere Sekretion an extrazellulären Matrix-Proteoglycanen (Abb. 14, Abb. 16: C) und Kollagen Typ II (Abb. 16: D) sowie eine deutliche Zunahme der Pelletgröße um etwa das Vierfache (Abb. 15).

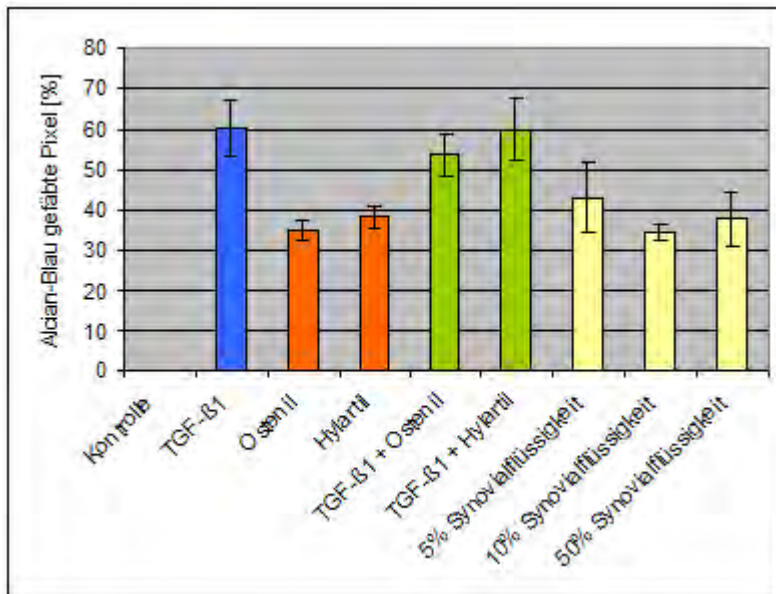


Abb. 14: Quantitative Expression Alcianblau gefärbter Proteoglycane im Verhältnis zum Gesamt-Pellet in chondrogen induzierten MSC der zweiten Passsage am 26. Tag Pellet-Kultur. Die Analyse wurde mittels der Software Adobe Photoshop® durchgeführt. Dabei wurden die Alcianblau gefärbten Pixel prozentual mit dem Gesamt-Pellet ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass TGF-β1 im Verhältnis zum Gesamt-Pellet die stärkste Proteoglycan-Expression induziert hat. Im Kontroll-Pellet war sie dagegen sehr niedrig (<1%).

Verglichen mit den TGF-β1 induzierten Zellen, zeigten mit 0,1 mg/ml Hyaluronsäure induzierte hochdichte 3D-Kulturen eine schwächere Alcian-Blau Färbung (Abb. 14) und eine geringere Pelletgröße (Abb. 15), aber eine vergleichbare Kollagen Typ II Expression (Abb. 17: B,D). Im Vergleich zur Kontrolle ist jedoch auch bei der Induktion mit Hyaluronsäure eine deutliche Zunahme an Proteoglycan-Expression und Pelletgröße zu erkennen (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 17: A,C).

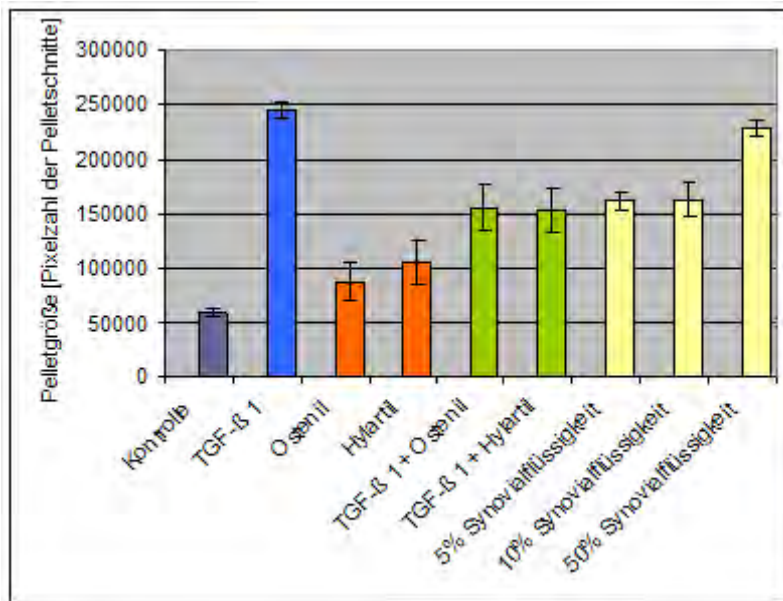


Abb. 15: Nahrungsweise Bestimmung der Pelletgröße in chondrogen induzierten MSC der zweiten Passage am 26. Tag Pellet-Kultur. Die Analyse wurde mittels der Software Adobe Photoshop® durchgeführt. Dabei wurden die Pixel der Pelletschnitte ausgezählt und gemittelt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Größenzunahme der induzierten Pellets gegenüber den Kontrollen.

Die Kombination der Differenzierungsfaktoren 10 ng/ml TGF-β1 und 0,1 mg/ml einer Hyaluronsäure (Hylartil® oder Ostenil®) führte zu Proteoglycan- und Kollagen Typ II Expression ähnlich der nur mit 10 ng/ml TGFβ-1 induzierten hochdichten 3D-Kulturen (Abb. 14, Abb. 18). Die Pelletgrößen erreichten jedoch nicht das Ausmaß TGF-β1 induzierter Pellets, waren aber größer als die, die mit Hyaluronsäure induzierten wurden (Abb. 15).

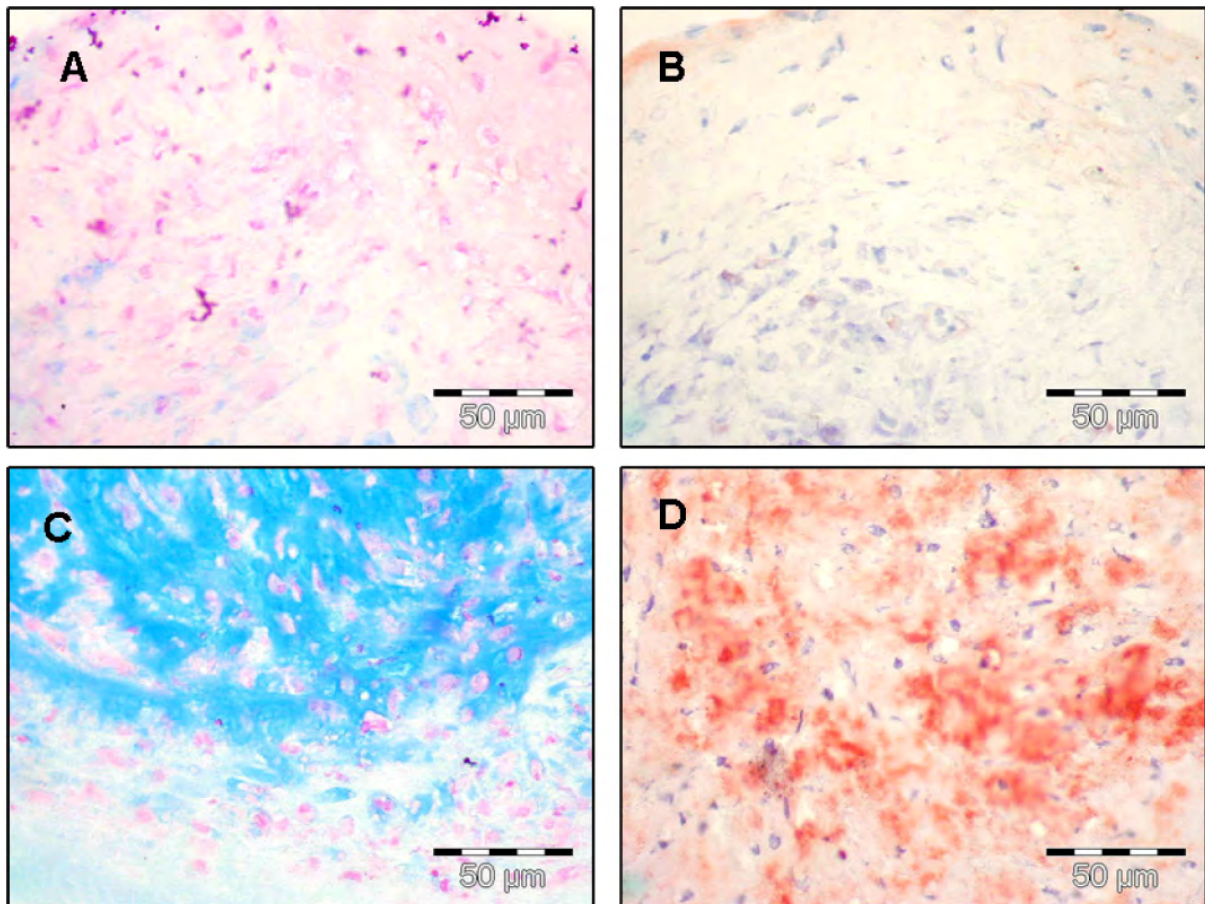


Abb. 16: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur. (A) Hochdichte 3D-Kulturen-Kulturen der Kontrollgruppe zeigen keine Proteoglycan-Expression. (B) Eine Expression des knorpelspezifischen Kollagen Typ II hat in den Kontroll-Pellets nicht stattgefunden, wie die negative monoklonale Antikörper-Färbung zeigt. (C) Bei mit 10 ng/ml TGF- β 1 induzierten hochdichten 3D-Kulturen ist eine deutliche Proteoglycan- und (D) Kollagenexpression zu beobachten.

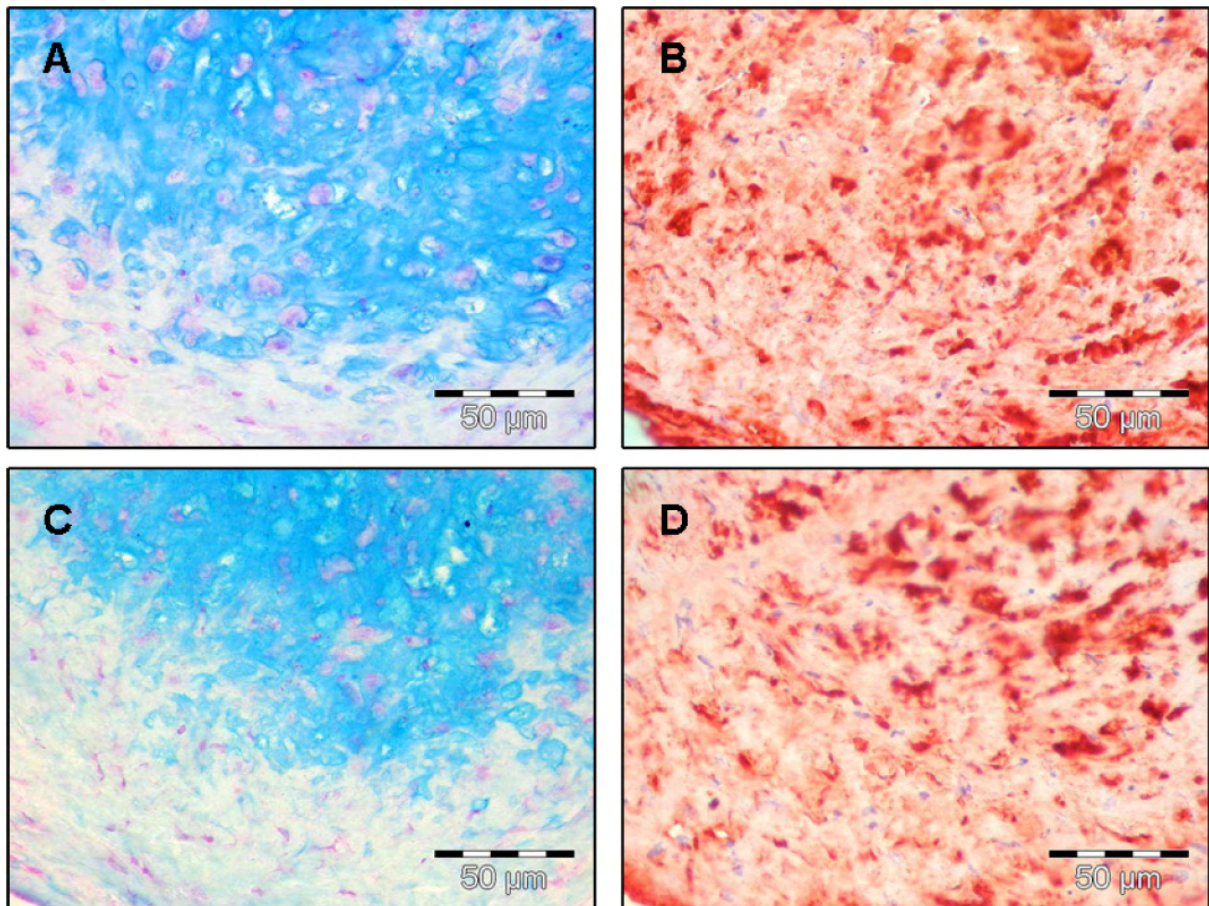


Abb. 17: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur mit Hyaluronsäuren als Differenzierungsfaktoren. (A) Bei 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Hylartil® zeigt sich hier eine deutliche Proteoglycan-Expression in der Alcianblau-Färbung, sowie eine (B) Expression des knorpelspezifischen Kollagen Typ II, erkennbar an der deutlich positiven monoklonalen Antikörper-Färbung. (C,D) Mit 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Ostenil® induzierte hochdichte 3D-Kulturen zeigen ein ähnliches Verhalten.

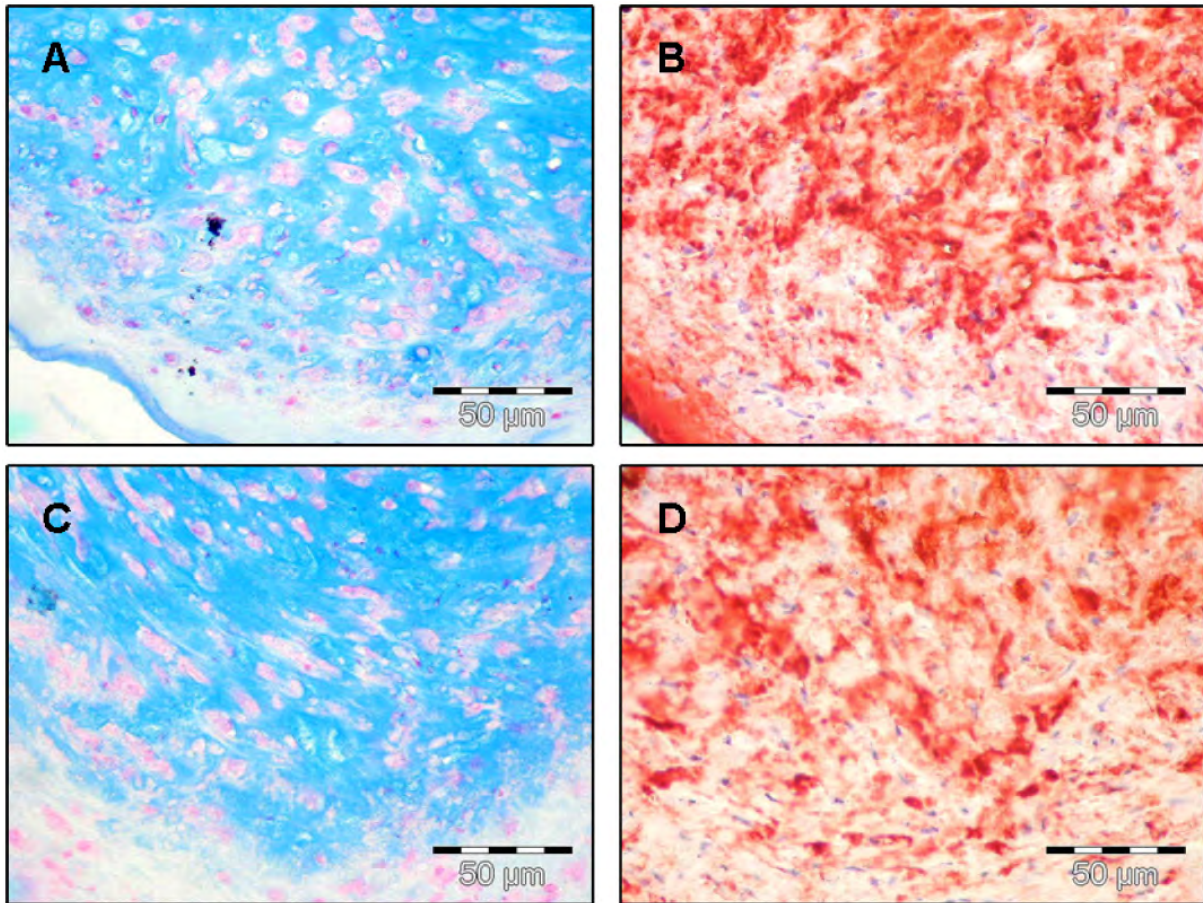


Abb. 18: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur mit Kombinationen von TGF- β 1 und Hyaluronsäuren als Differenzierungsfaktoren. (A) Die Kombination von 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Hylartil® mit 10 ng/ml TGF- β 1 führt zu einer starken Proteoglycan-Expression in der Alcianblau-Färbung, sowie zu einer (B) deutlichen Expression des knorpelspezifischen Kollagen Typ II, erkennbar an der positiven monoklonalen Antikörper-Färbung. (C,D) Die Kombination von 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Ostenil® mit 10 ng/ml TGF- β 1 zeigt ein ähnliches Ergebnis.

3.2.2 Autologe Synovialflüssigkeit als induzierender Faktor der Chondrogenese

Alle getesteten Konzentrationen (5%, 10%, and 50%) autologer Synovialflüssigkeit induzierten die Chondrogenese. Auch hier zeigte sich eine starke Proteoglycan-Sekretion (Abb. 19: A,C,E) und eine hohe Kollagen Typ II Expression (Abb. 19: B,D,F) in meist übereinstimmenden Bereichen (Abb. 13). Die Pelletgröße ist bei einer Konzentration von 50% am größten, wo sie fast das Ausmaß TGF β -1 induzierter Pellets erreicht. (Abb. 15). Bei 5% und 10% Synovialflüssigkeit ist die Pelletgröße vergleichbar mit den Pellets, die mit einer Kombination von TGF- β 1 und Hyaluronsäure induziert wurden.

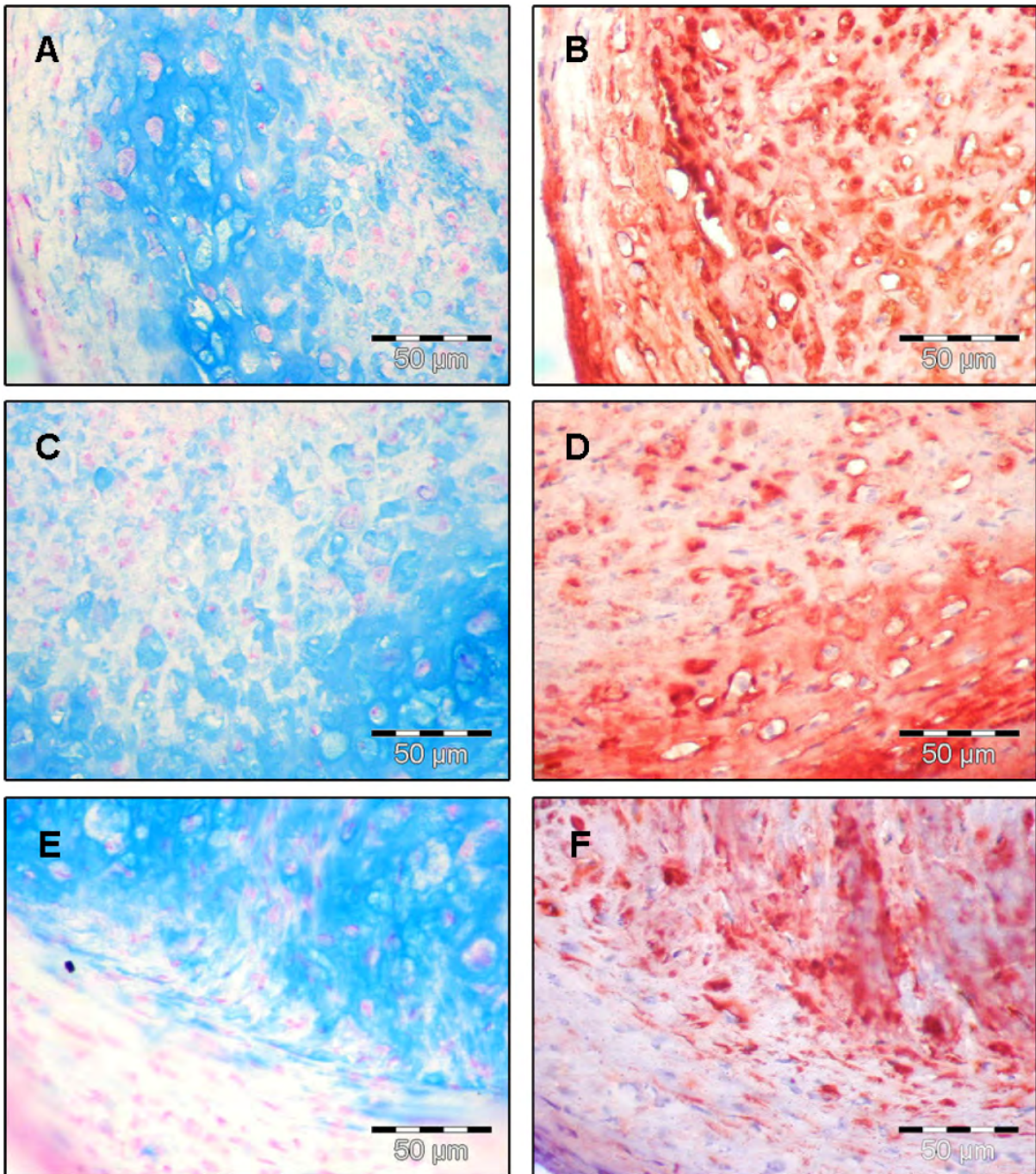


Abb. 19: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur mit autologer Synovialflüssigkeit als Differenzierungsfaktor. (A,C,E) Unabhängig der Konzentration an Synovialflüssigkeit (5%, 10%, 50%) im Medium zeigten alle hochdichten 3D-Kulturen eine starke Proteoglycan-Expression anhand der Alcianblau-Färbung, (B,D,F) sowie eine starke Kollagen Typ II Expression mittels monoklonaler Antikörper-Färbung.

3.2.3 Quantitative Proteoglycan-Expression chondrogenetisch induzierter MSC

Alle getesteten Konzentrationen (5%, 10%, and 50%) autologer Synovialflüssigkeit induzierten die Chondrogenese. Auch hier zeigte sich eine starke Proteoglycan-Sekretion (Abb. 19: A,C,E) und eine hohe Kollagen Typ II Expression (Abb. 19: B,D,F) in meist übereinstimmenden Bereichen (Abb. 13). Die Pelletgröße ist bei einer Konzentration von 50% am größten, wo sie fast das Ausmaß TGF β -1 induzierter Pellets erreicht. (Abb. 15). Bei 5% und 10% Synovialflüssigkeit ist die Pelletgröße vergleichbar mit den Pellets, die mit einer Kombination von TGF- β 1 und Hyaluronsäure induziert wurden.

Deutliche Unterschiede wurden in der Menge der sekretierten Proteoglycane gefunden. Die Analyse wurde mittels digitalisierter Bilder histologischer Schnitte mit Alcian-Blau Färbung durchgeführt. In den mit 0,1 mg/ml Hyaluronsäure induzierten hochdichten 3D-Kulturen fand sich eine im Verhältnis zum Gesamt-Pellet deutlich höhere Proteoglycan-Sekretion (35-38%) als in der Kontrollgruppe (<1%). Sie war jedoch eindeutig kleiner als in den mit 10 ng/ml TGF β -1 induzierten hochdichten 3D-Kulturen (60%) (Abb. 14). Die Kombination von 10 ng/ml TGF β -1 mit 0,1 mg/ml einer Hyaluronsäure (Hylartil® oder Ostenil®) zeigte eine im Verhältnis zum Gesamt-Pellet vergleichbare Proteoglycan-Sekretion (54-60%) wie die nur mit TGF- β 1 induzierten hochdichte 3D-Kulturen (Abb. 14). Zwischen den getesteten Hyaluronsäuren Hylartil® und Ostenil® war im Ergebnis kein wesentlicher Unterschied auszumachen. Hylartil® fördert allein und in Kombination mit 10 ng/ml TGF- β 1 die Proteoglycan-Sekretion etwas stärker (Abb. 14). Bei den mit Synovialflüssigkeit induzierten hochdichten 3D-Kulturen fördert die Konzentration von 5% Synovialflüssigkeit die Proteoglycan-Sekretion im Verhältnis zum Gesamt-Pellet am stärksten (Abb. 14). Insgesamt blieben die nur mit Hyaluronsäure und nur mit Synovialflüssigkeit induzierten hochdichten 3D-Kulturen in der Proteoglycan-Sekretion im Verhältnis zum Gesamt-Pellet mit (35-43%) deutlich hinter den mit TGF β -1 induzierten hochdichten 3D-Kulturen (60%) zurück (Abb.14).

3.3 Equine MSC im bioresorbierbaren Polymer-Vlies

Equine MSC wurden mittels Zellsuspension und Fibrin in die Vliesstruktur eingebracht. Dort wurden sie unter Zusatz der chondrogenen Differenzierungsfaktoren 10 ng/ml TGF- β 1 oder 5% autologer Synovialflüssigkeit für 26 Tage kultiviert (Abb. 20). Allerdings zeigte sich im Laufe der Kultivierung ein starkes Migrationsbestreben der Zellen aus den Vliesen heraus. So waren in

der Kontrollgruppe am Ende im gesamten Vlies nur vereinzelte Zellgruppen in Randbereichen zu finden (Abb. 20: A, Abb. 21). Auf den Boden der Well-Platten konnte man mikroskopisch entsprechend zahlreiche migrierte MSC erkennen. Die Vliese der Kontrollgruppe blieben weich, biegsam und in ihrer Größe unverändert. Die mit 10 ng/ml TGF- β 1 induzierten Vliesen zeigten ein ähnliches Migrationsverhalten der Zellen, allerdings kam es vereinzelt zu einem massiven Zellwachstum, das auf einigen Stellen der Vliesoberfläche zu festen Zellansammlungen beachtlicher Größe führte (Abb. 22: B). Insgesamt war aber im Vlies, speziell in der Peripherie, eine deutlich höhere Zelldichte als in der Kontrollgruppe sichtbar (Abb. 20: B, Abb. 22: A). Makroskopisch zeigte das Vlies eine heterogene Struktur weicher und harter Stellen und war insgesamt vergrößert. Unter 5% autologer Synovialflüssigkeit siedeln sich die Zellen im Vergleich am besten gleichmäßig und in hohen Zelldichten im Vlies an (Abb. 20: C). Es kommt auch im Vergleich zu den mit TGF- β 1 induzierten Vliesen zu einer wesentlich homogeneren Abkapslung durch Zellformationen, so dass die eigentliche Vliesstruktur kaum noch direktem Kontakt nach außen hat (Abb. 20: C, Abb. 23: A) Makroskopisch zeigten diese Vliese eine homogene, knorpelartige und schnittfeste Struktur und waren deutlich vergrößert.

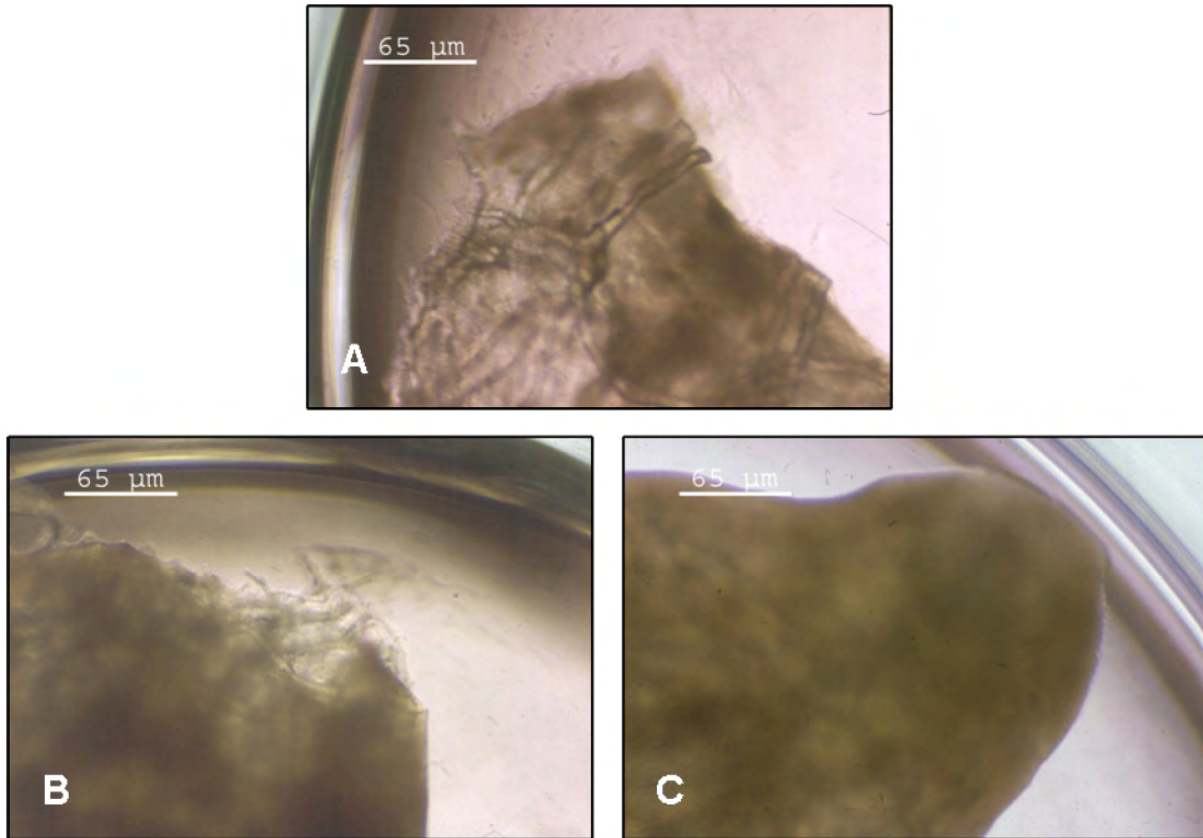


Abb. 20: Photomikrographien von Vliesen am 26. Kulturtag, die mit MSC der zweiten Passage besiedelt wurden. (A) In den Kontroll-Vliesen sieht man nur eine schwache zelluläre Besiedlung und Bildung extrazellulärer Matrix (braune flächige Strukturen). Die Vlies-Fasern sind noch deutlich erkennbar und es existiert keine klare glatte Abgrenzung der Vliese nach außen hin. (B) Hier wurden die MSC mit 10 ng/ml TGF- β 1 induziert. Im Vergleich zur Kontrolle hat hier eine deutlich stärkere zelluläre Besiedlung und Bildung extrazellulärer Matrix stattgefunden. Vlies-Fasern sind zum Teil noch erkennbar, eine glatte Abgrenzung nach außen teilweise vorhanden. (C) Bei Induktion der MSC mit 5% Synovialflüssigkeit findet sich eine fast homogene Vliesfläche, die sich klar glatt nach außen abgrenzt. Dies spricht für eine starke zelluläre Besiedlung mit reichlicher Bildung extrazellulärer Matrix.

3.3.1 Chondrogene Differenzierung in Vliesstrukturen

Der Einfluss von TGF- β 1 und autologer Synovialflüssigkeit auf die chondrogene Differenzierung equiner MSC im Vlies wurde untersucht.

Das Potential der MSC sich unter den genannten Faktoren im Vlies zu Zellen zu differenzieren, die die für Knorpel typischen Proteoglycane sekretieren, wurde durch deren Anfärbung mit Alcian-Blau bei einem pH von 2,5 nachgewiesen (Abb. 22: A-D, Abb. 23: A-C). Der Versuch knorpelspezifisches Kollagen Typ II und bindegewebstypisches Kollagen Typ I mittels immunohistochemischer Färbemethoden nachzuweisen misslang (Abb. 22: E, F, Abb. 23: D-F), so dass die

Aussage einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung sich hier nur auf die Proteoglycansekretion stützt.

3.3.2 Einfluss von TGF- β 1 und Synovialflüssigkeit auf den Aufbau extrazellulärer Matrix im Vlies

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 20: A, Abb. 21) zeigen die durch 10 ng/ml TGF- β 1 (Abb. 20: B, Abb. 22) oder 5% Synovialflüssigkeit (Abb. 20: C, Abb. 23) induzierten Zellen im Vlies einen deutlichen Aufbau extrazellulärer Matrix, der makroskopisch zum einen durch die Größenzunahme der Vliese und zum anderen durch Veränderung der Konsistenz (siehe Kap. 3.3) der Vliese evident wurde. Histologisch lies sich in unserer Studie nur die Proteoglycan-Komponente der extrazellulären Matrix nachweisen. Die mit 10 ng/ml TGF- β 1 induzierten Zellen zeigten in der Peripherie der Vliese eine schwache Proteoglycan-Expression, während die in Kap. 3.3 beschriebenen Zellansammlungen auf der Vliesoberfläche mit einer deutlich stärkeren und homogenen Proteoglycan-Expression imponierten (Abb. 22: A-D). Unter 5% Synovialflüssigkeit finden sich dagegen im Vlies, zentral wie peripher, Inseln starker Proteoglycan-Expression (Abb. 23: A,B). Oft ist auch eine perizelluläre Verdichtung der Proteoglycan-Dichte erkennbar (Abb. 23: C). Die Alcian-Blau Färbungen beider Differenzierungsfaktoren (Abb. 22: C,D, Abb. 23: B,C) zeigen eine den nativen Knorpel (Abb. 12: A,B) ähnliche Morphologie, wobei sie nur bei Induktion mit Synovialflüssigkeit auch wirklich im Vlies integriert ist (Abb. 23: B,C).

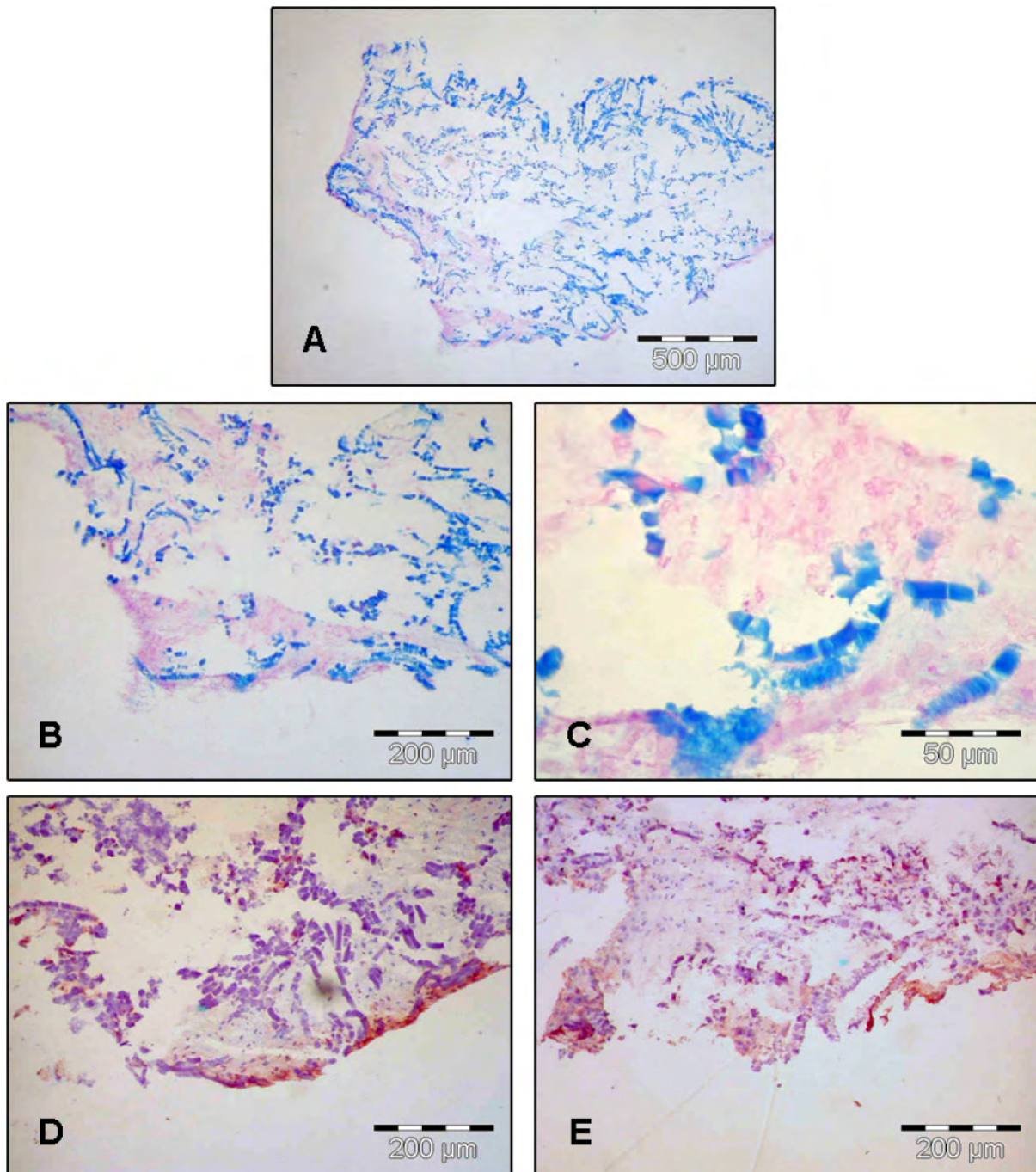


Abb. 21: Digitale Photomikrographien von einem Kontroll-Vlies am 26. Kulturtag, das mit equinen MSC der Passage 2 besiedelt wurde. (A,B,C) In der Alcianblau-Färbung stellen sich die Vlies-Fasern dunkelblau dar. Eine schwache Besiedlung in Randbereichen des Vlies hat stattgefunden, jedoch keine Proteoglycan-Expression. (D) Die monoklonalen Antikörper-Färbungen für Kollagen Typ II und (E) Kollagen Typ I sind negativ.

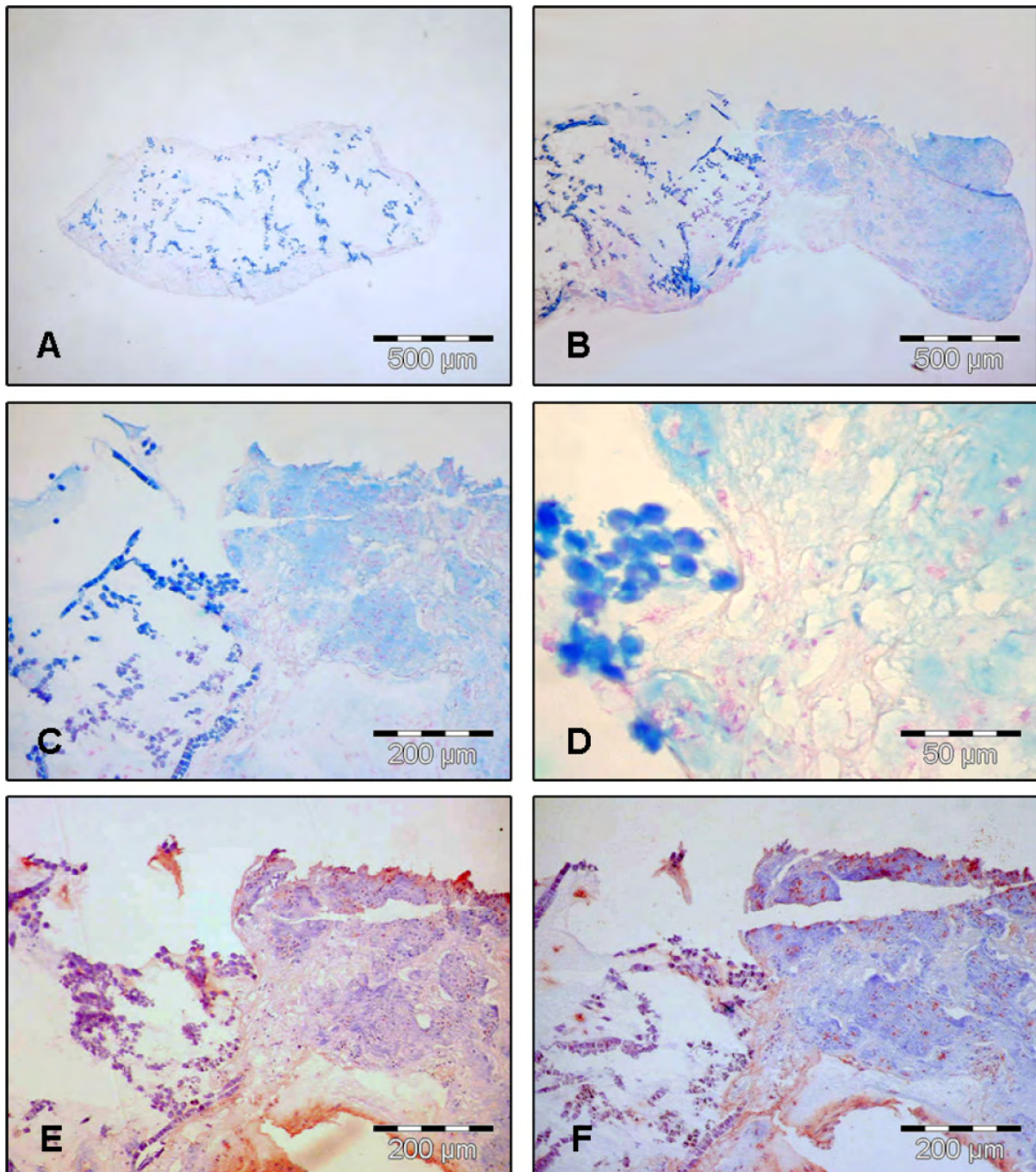


Abb. 22: Digitale Photomikrographien von einem Vlies am 26 Kulturtag, das unter dem Differenzierungsfaktor 10 ng/ml TGF- β 1 mit equinen MSC der Passage 2 besiedelt wurde. In der Alcianblau-Färbung stellen sich die Vlies-Fasern dunkelblau dar. (A,B,C) In den Alcianblau-Färbungen zeigt sich eine ausgeprägte Proteoglycansekretion in den Zellauflagerungen am Vlies. Im Vlies selbst allerdings nur schwach in den Randbereichen. (D) In dieser Alcianblau-Färbung wird die ähnliche Morphologie zum nativen Knorpel deutlich. (E) Die monoklonalen Antikörper-Färbungen für Kollagen Typ II und (F) Kollagen Typ I sind negativ.

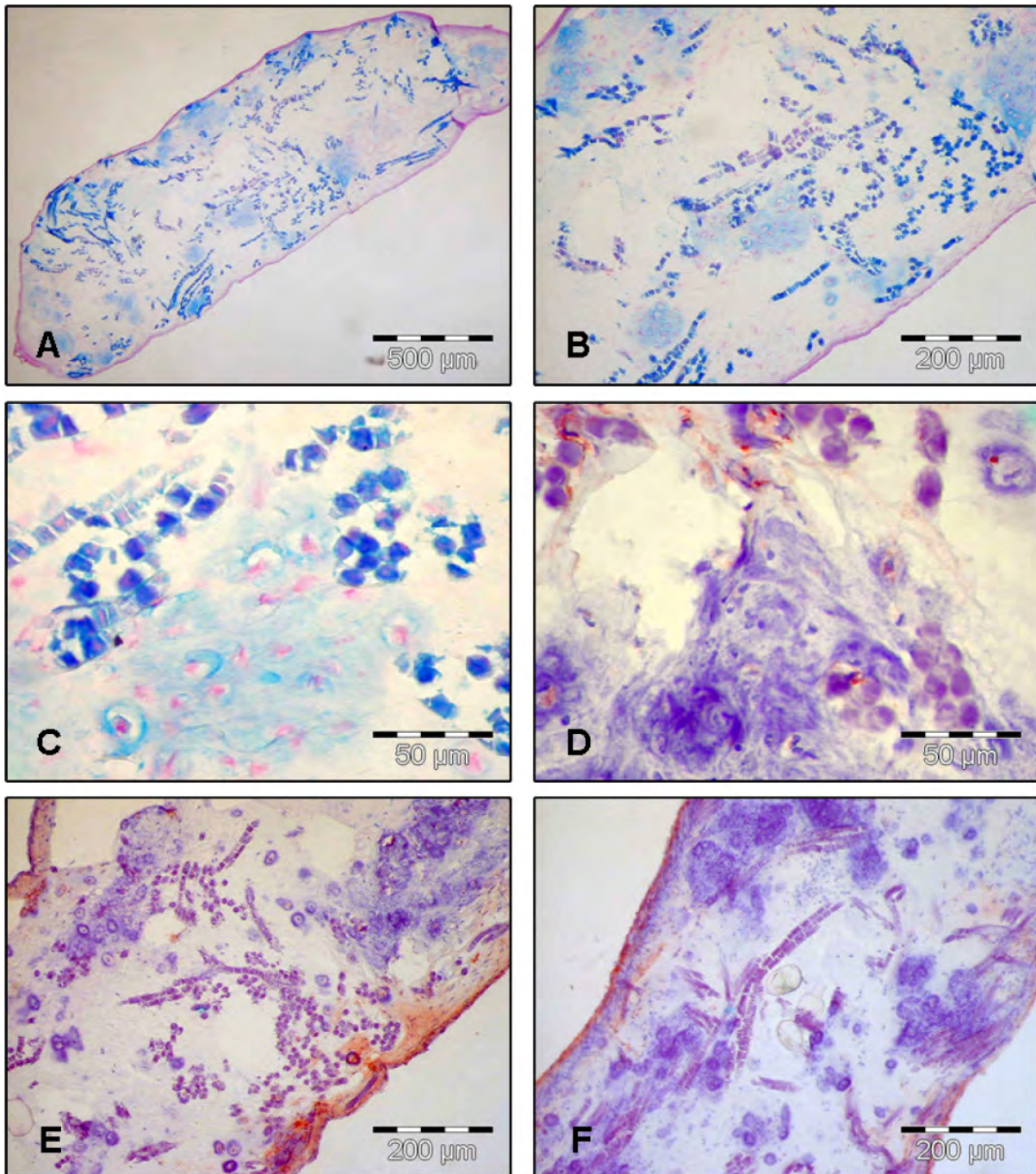


Abb. 23: Digitale Photomikrographien von einem Vlies am 26 Kulturtag, das unter dem Differenzierungsfaktor 10 ng/ml TGF- β 1 mit equinen MSC der Passage 2 besiedelt wurde. In der Alcianblau-Färbung stellen sich die Vlies-Fasern dunkelblau dar. (A,B,C) In den Alcianblau-Färbungen zeigt sich eine ausgeprägte Proteoglycansekretion in den Zellauflagerungen am Vlies. Im Vlies selbst allerdings nur schwach in den Randbereichen. (D) In dieser Alcianblau-Färbung wird die ähnliche Morphologie zum nativen Knorpel deutlich. (E) Die monoklonalen Antikörper-Färbungen für Kollagen Typ II und (F) Kollagen Typ I sind negativ.