



**KAREN JOHN**

---

**Magnetresonanztomographischer semiquantitativer  
Nachweis von kontrastmittelmarkierten mesenchymalen  
Stammzellen in chondralen Defekten am  
Kniegelenk des Hundes**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere, Chirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

**Magnetresonanztomographischer semiquantitativer Nachweis von  
kontrastmittelmarkierten mesenchymalen Stammzellen in  
chondralen Defekten am Kniegelenk des Hundes**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Karen John**

Tierärztin aus Hamm (Westf.)

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

Tag der Disputation: 19.02.2016

*„Das Wichtigste ist die Gewissheit, dass jemand an einen glaubt.“*

Für meine Familie und meine Freunde



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> _____	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> _____	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> _____	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> _____	<b>XVI</b>
<b>1 Einleitung</b> _____	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> _____	<b>3</b>
<b>2.1 Die Magnetresonanztomographie</b> _____	<b>3</b>
2.1.1 Einleitung _____	3
2.1.2 Klinischer Einsatz _____	3
2.1.3 Physikalische Grundlagen _____	5
2.1.3.1 Protonen im Magnetfeld _____	5
2.1.3.2 T1 – Relaxation _____	8
2.1.3.3 T2 – Relaxation _____	10
2.1.3.4 Bildkontrast in der MRT _____	11
2.1.3.5 Repetitionszeit (TR) _____	11
2.1.3.6 Echozeit (TE) _____	12
2.1.3.7 Protonendichte gewichtete Bilder _____	12
2.1.3.8 Sättigung _____	13
2.1.3.9 Pulswinkel und Vorsättigung _____	13
2.1.3.10 Ortskodierung _____	14
2.1.3.11 Artefakte _____	17
2.1.4 MRT – Kontrastmittel _____	18
2.1.4.1 Klinischer Einsatz _____	18
2.1.4.2 Magnetische Suszeptibilität _____	19
2.1.4.3 Einteilung der Kontrastmittel _____	21
2.1.4.4 Ferumoxide: Endorem® _____	23
<b>2.2 Stammzellen</b> _____	<b>26</b>
2.2.1 Ursprung und Definition _____	26
2.2.2 Geschichtlicher Rückblick _____	28
2.2.3 Mesenchymale Stammzellen _____	28

## Inhaltsverzeichnis

2.2.4 Stammzelltherapie _____	31
2.2.5 Zellmarkierung _____	31
<b>2.3 Anatomische Grundlagen Kniegelenk Hund _____</b>	<b>34</b>
2.3.1 Einteilung _____	34
2.3.2 Kniekehlgelenk _____	34
2.3.2.1 Aufbau und funktionelle Eigenschaften _____	34
2.3.2.2 Gelenkkapsel _____	35
2.3.3 Kniescheibengelenk _____	36
2.3.3.1 Aufbau und funktionelle Eigenschaften _____	36
2.3.3.2 Gelenkkapsel _____	36
2.3.4 Bandverbindungen _____	36
2.3.4.1 Bänder des Kniekehlgelenkes _____	36
2.3.4.2 Bänder des Kniescheibengelenkes _____	37
2.3.4.3 Mensikenhaltebänder _____	38
2.3.5 Synovia _____	39
2.3.6 Gelenkknorpel _____	40
2.3.6.1 Bestandteile und Eigenschaften _____	40
2.3.6.2 Knorpelzonen _____	41
2.3.6.3 Chondrale Ossifikation _____	43
2.3.6.4 Knorpeldefekte _____	44
<b>3 Material und Methoden _____</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Material _____</b>	<b>51</b>
3.1.1 Probengewinnung Fettgewebe _____	51
3.1.2 Matrix _____	51
<b>3.2 Methoden _____</b>	<b>52</b>
3.2.1 Zellkultur _____	52
3.2.1.1 Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen (ADMSCs) aus dem Fettgewebe _____	52
3.2.1.2 Kultivierung der ADMSCs _____	53
3.2.1.3 Passage der kultivierten ADMSCs _____	54
3.2.1.4 Kryokonservierung der ADMSCs _____	54
3.2.1.5 Auftauen der ADMSCs _____	55
3.2.1.6 Endorem® Zellmarkierung _____	55
3.2.1.7 Eisennachweis: Berliner Blau Färbung _____	56

## Inhaltsverzeichnis

3.2.1.8 Vitalitätstests	57
3.2.1.8.1 Die Phalloidin Fluoreszenzfärbung	57
3.2.1.8.2 MTT Test	59
3.2.1.8.3 Life Cell Imaging	60
3.2.1.9 Elektronenmikroskopie	62
3.2.1.10 Übersicht Verlaufsplan Zellkultur	64
3.2.2 MRT Messung (Kadaverstudie)	66
3.2.2.1 Knorpeldefekt	66
3.2.2.2 Herstellung des zellhaltigen Kollagengels	67
3.2.2.3 Implantation des Zell – Gelgemisches	69
3.2.2.4 Wundverschluss	69
3.2.2.5 Magnetresonanztomographische Messung	69
3.2.3 Ergänzende Untersuchungen	73
3.2.3.1 Zellauswanderung aus dem Gelpellet im Life Cell Imaging	73
3.2.3.2 Zytotoxizitätstest im Life Cell Imaging (20GNL®)	75
3.2.3.3 MTT Vergleichstest	76
3.2.4 Statistische Planung und Auswertung	77
3.2.4.1 MTT Test	77
3.2.4.2 Life Cell Imaging	78
3.2.4.3 MRT	79
3.2.4.4 MTT Vergleichstest	80
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>81</b>
<b>4.1 Eisennachweis: Berliner Blau Färbung</b>	<b>81</b>
<b>4.2 Vitalitätstests</b>	<b>83</b>
4.2.1 Phalloidin Fluoreszenzfärbung	83
4.2.2 MTT Test	86
4.2.3 Life Cell Imaging	93
<b>4.3 Elektronenmikroskopie</b>	<b>100</b>
<b>4.4 MRT Messung</b>	<b>105</b>
4.4.1 Defektlokalisierung, Defektgröße	105
4.4.2 Objektive Auswertung	107
4.4.3 Subjektive Auswertung	109
<b>4.5 Ergänzende Untersuchungen</b>	<b>111</b>
4.5.1 Kompatibilität Zellen / Matrix	111

## Inhaltsverzeichnis

4.5.1.1 Zellauswanderung aus Gelpellet im Life Cell Imaging _____	111
4.5.1.2 Zytotoxizitätstest im Life Cell Imaging (20GNL®) _____	122
4.5.1.3 MTT Vergleichstest _____	123
<b>5 Diskussion _____</b>	<b>132</b>
<b>5.1 Allgemeines _____</b>	<b>132</b>
<b>5.2 Methodik der Untersuchung _____</b>	<b>132</b>
5.2.1 Studiendesign _____	132
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse _____	133
5.2.2.1 Eisennachweis: Berliner Blau Färbung _____	133
5.2.2.2 Vitalitätstests _____	134
5.2.2.3 Elektronenmikroskopie _____	141
5.2.2.4 MRT Messung _____	142
5.2.2.5 Ergänzende Untersuchungen _____	148
<b>6 Zusammenfassung _____</b>	<b>152</b>
<b>7 Summary _____</b>	<b>154</b>
<b>8 Literaturverzeichnis _____</b>	<b>156</b>
<b>9 Anhang _____</b>	<b>171</b>
<b>9.1 Tabellen zu Material und Methoden _____</b>	<b>171</b>
9.1.1 Verwendete Stoffe _____	171
9.1.2 Verwendete Materialien _____	172
9.1.3 Verwendete Geräte _____	174
9.1.4 Verwendete Softwareprodukte _____	175
<b>9.2 Tabellen zu den Ergebnissen _____</b>	<b>176</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner
>	größer
%	Prozent
°	Grad
a1 bis j1	rechte Knie
a2 bis j2	linke Knie
Abb.	Abbildung
ADMSC	adipose derived mesenchymal stem cells
AMI – 25 <sup>®</sup>	advanced magnetic imaging (= Endorem <sup>®</sup> )
Art.	Articulatio
ASC	adult stem cells
B	magnetisches Moment
B <sub>0</sub>	äußeres homogenes Magnetfeld
°C	Grad Celcius
C3 - Spule	Oberflächen Empfangsspule
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
D <sub>1</sub>	Delta 1
D <sub>m</sub>	Delta der Steigung m
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
- E	nicht Endorem <sup>®</sup> markierte Zellen (negativ Kontrolle)
+ E	Endorem <sup>®</sup> markierte Zellen (positiv Kontrolle)
ELO	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	embryonic stem cells
f	Frequenz
FBS	Fetales Bovines Serum
Fe <sup>2+</sup>	zweiwertiges Eisen

## Abkürzungsverzeichnis

Fe <sup>3+</sup>	dreiwertiges Eisen
FFE	fast field echo
G	Gauge
g	Gramm
g.	Erdbeschleunigung
Gd	Gadolinium
Gd – DOTA	Gadotersäure
Gd – DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin
Gd – EOB – DTPA	Gadolenium-Ethoxybenzyl-Diethylenriamin-Pentaessigsäure
H	Höhe (Defekt)
h	Stunde/n
H <sub>0</sub>	Nullhypothese
HCl	Salzsäure
Hd	Hund (Spendertier)
HF Impuls	Hochfrequenzimpuls
Hz	Herz
in <sup>2</sup>	Inch <sup>2</sup>
KDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Konz	Konzentration
l	Liter
LM	Lösungsmittel (= 20GNL <sup>®</sup> )
Lig	Ligamentum
Ligg.	Ligamenta
M.	Musculus
m	Steigung der Wachstumskurven (= Proliferationskapazität)
m.	Molar
M <sub>XY</sub>	transversale Magnetisierung
M <sub>Z</sub>	longitudinale Magnetisierung, Längsmagnetisierung
max.	maximal
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute/n
Mio	Millionen

## Abkürzungsverzeichnis

Mittelw.	Mittelwert
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mm	Millimeter
$\mu$ m	Mikrometer
mOsm	Milliosmol
mPa	Millipascal
MPC	mesodermal progenitor cells
MR	Magnet Resonanz
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
ms	Millisekunde
MSC	mesenchymal stem cells
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (= NAD)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (= NADP)
NaOH	Natriumhydroxid
neg.	negativ
nm	Nanometer
norm.	normiert
O	Sauerstoff
OCD	Osteochondrosis dissecans
OsO <sub>4</sub>	Osmium tetroxide
P0	Passage 0
P1	Passage 1
P2	Passage 2
P3	Passage 3
P4	Passage 4
PD	Protonendichte
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH – Wert
P/S	Penicillin / Streptomycin
q.s.	quantum satis (so viel wie nötig)/ Streptomycin
r	Radius (Defekt)
r <sup>2</sup>	Determinationskoeffizient

## Abkürzungsverzeichnis

ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sec	Sekunden
SI – Differenz	Intensitätsdifferenz der Signale
SPIO	superparamagnetic iron oxid
Std. Abw.	Standardabweichung
t	Zeit
T1	longitudinale Relaxationszeit
T1 – Relaxation	longitudinale Relaxation (Spin – Gitter)
T2	transversale Relaxationszeit
T2 – Relaxation	transversale Relaxation (Spin – Spin)
TE	Echozeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TI	Inversionszeit
TR	Repetitionszeit
TSE	Turbospinecho
V	Volumen (Defekt)
v.Chr.	vor Christus
$\omega_0$	Larmorfrequenz
y	gyromagnetisches Moment
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung eines Protonen Spins ( <i>modifiziert nach Westbrook et al. 2011</i> )	5
Abb. 2	Ausrichtung der Vektoren der Spins im Raum ( <i>modifiziert nach Westbrook et al. 2011</i> )	6
Abb. 3	Ausrichtung der Protonen Spins unter Einwirkung eines äußeren homogenen Magnetfeldes $B_0$ ( <i>modifiziert nach Westbrook et al. 2011</i> )	6
Abb. 4	Schematische Darstellung der Spin Präzessionsbewegung ( <i>modifiziert nach Westbrook et al. 2011</i> )	7
Abb. 5	Übergang der Längsmagnetisierung $M_z$ in die Transversalmagnetisierung $M_{xy}$ . ( <i>modifiziert nach Bushberg et al. 2002</i> )	7
Abb. 6	Schematische Darstellung der Vektoraddition (Spins), Entstehung der transversalen Magnetisierung $M_{xy}$ . ( <i>modifiziert nach Bushberg et al. 2002</i> )	8
Abb. 7	Schematische Darstellung der T1 / Longitudinale Relaxation ( <i>modifiziert nach Bushberg et al. 2002</i> )	9
Abb. 8	Verlaufskurven der longitudinalen Relaxation am Beispiel Fett und Wasser. ( <i>modifiziert nach Reiser u. Semmler 2002</i> )	9
Abb. 9	Schematische Darstellung der T2 / Transversale Relaxation ( <i>modifiziert nach Buschberg et al. 2002</i> )	10
Abb. 10	Verlaufskurven der transversalen Relaxation am Beispiel Fett und Wasser. ( <i>modifiziert nach Reiser u. Semmler 2002</i> )	11
Abb. 11	Schematische Darstellung der XYZ Ebenen innerhalb des MRT.	14

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 12	Schematische Darstellung des Verhältnisses von angeregter Schichtdicke zum Magnetfeldgradienten in Z - Richtung. <i>(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)</i>	15
Abb. 13	Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Gradienten der Magnetfeldstärke in Z - Richtung und der vorliegenden Larmofrequenz. <i>(modifiziert nach Buschberg et al. 2002)</i>	15
Abb. 14	Schematische Darstellung der Phasenkodierung <i>(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)</i>	16
Abb. 15	Magnetresonanztomographische Darstellung eines Agargel - Phantoms (T2 – gewichtet)	21
Abb. 16	Kristallgitterstruktur von Endorem® <i>(modifiziert nach Fahlvik et al. 1993)</i>	24
Abb. 17	Schemadarstellung zur Selbsterneuerung von Stammzellen	26
Abb. 18	Übersicht Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen <i>(modifiziert nach Kühl u. Kühl 2012)</i>	30
Abb. 19	Schematische Darstellung des Spiralgelenk <i>(modifiziert nach Salomon et al. 2008)</i>	35
Abb. 20	Kraniolaterale Ansicht des Kniegelenkes mit Übersicht der Bänder des Kniescheibengelenkes <i>(modifiziert nach König u. Liebich 2011)</i>	38
Abb. 21	Übersicht über die Mensikenhaltebänder <i>(modifiziert nach Tobias u. Johnston 2011)</i>	39
Abb. 22	Schematische Darstellung der Knorpelzonen <i>(modifiziert nach Salomon et al. 2008)</i>	42
Abb. 23	Mediolaterale Röntgenaufnahme des Kniegelenkes mit osteochondrotischem Defekt.	47
Abb. 24	Kraniokaudale Röntgenaufnahme des Kniegelenkes mit osteochondrotischem Defekt.	47
Abb. 25	Zwei Komponenten (ChondroFiller liquid) <i>Amedrix</i>	52

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 26	Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Berliner Blau Färbung.	56
Abb. 27	Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Phalloidin Färbung.	58
Abb. 28	Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für den MTT Test	60
Abb. 29	Versuchsansatzes für das Life Cell Imaging	61
Abb. 30	Ausmessung - Life Cell Imaging	62
Abb. 31	Versuchsansatz für das Elektronenmikroskop	63
Abb. 32	Elektronenmikroskop 109 ( <i>Carl Zeiss</i> )	64
Abb. 33	Darstellung Zylindervolumen ( <i>modifiziert nach <a href="http://www.mathematik-wissen.de">http://www.mathematik-wissen.de</a></i> )	66
Abb. 34	Eröffnetes Kniegelenk mit künstlich gesetztem Knorpeldefekt	67
Abb. 35	<i>Amedrix</i> Matrix System ChondroFiller liquid	68
Abb. 36	MRT System der <i>Firma Philips Medical System, 1 Tesla</i>	70
Abb. 37	C3 Oberflächenspule der <i>Firma Philips Medical System</i>	70
Abb. 38	<i>Region of Interests</i> im T2* – gewichteter (3D) FFE Schnitt	72
Abb. 39	<i>Region of Interests</i> im T2* – gewichteter (3D) FFE Schnitt, subjektiven Messung	73
Abb. 40	Versuchsansatz für die Untersuchung der Zellauswanderung aus dem Gelpellet.	74
Abb. 41	Phasenkontrast Aufnahme zum Start des Life Cell - Auswanderungsversuches aus dem Gel Pellet.	74
Abb. 42	Vial 20GNL <sup>®</sup> Neutralisationslösung ( <i>Amedirx</i> )	76
Abb. 43	Versuchsansatz Zytotoxizitätstest 20GNL <sup>®</sup> ( <i>Amedrix</i> )	76
Abb. 44	Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für den MTT Vergleichstest	77
Abb. 45	Charakteristische Wachstumskurve der Zellen in der Live Cell Imaging	

## Abbildungsverzeichnis

	<i>(modifiziert nach Application note 30 der Firma Ibidi GmbH)</i>	79
Abb. 46	Berliner Blau Färbung, Hd 16/13 + E	81
Abb. 47	Berliner Blau Färbung, Hd 6/13 + E	81
Abb. 48	Berliner Blau Färbung, Hd 7/13 + E	82
Abb. 49	Berliner Blau Färbung, Hd 7/13 – E	82
Abb. 50	Berliner Blau Färbung, Hd 4/13 + E	82
Abb. 51	Berliner Blau Färbung, Hd 4/13 – E	82
Abb. 52	Phalloidin Färbung, Hd 4/13 + E	83
Abb. 53	Phalloidin Färbung, Hd 11/13 + E	83
Abb. 54	Phalloidin Färbung, Hd 6/13 + E	84
Abb. 55	Phalloidin Färbung, Hd 6/13 – E	84
Abb. 56	Phalloidin Färbung, Hd 7/13 + E	84
Abb. 57	Phalloidin Färbung, Phasenkontrast Aufnahme, Hd 7/13 + E	84
Abb. 58	Phalloidin Färbung, Hd 4/13 + E	85
Abb. 59	Phalloidin Färbung, Phasenkontrast Aufnahme, Hd 4/13 + E	85
Abb. 60	Phalloidin Färbung, Hd 4/13 – E	85
Abb. 61	Phalloidin Färbung, Phasenkontrast Aufnahme, Hd 4/13 – E	85
Abb. 62	MTT Test, Zellpopulation Hd 4/13, Wachstumskurven	89
Abb. 63	MTT Test, Zellpopulation Hd 6/13, Wachstumskurven	90
Abb. 64	MTT Test, Zellpopulation Hd 7/13, Wachstumskurven	90
Abb. 65	MTT Test, Zellpopulation Hd 11/13, Wachstumskurven	90
Abb. 66	MTT Test, Zellpopulation Hd 16/13, Wachstumskurven	91
Abb. 67	MTT Test, interspezifischer Vergleich der neg. Kontrolle (- E)	92
Abb. 68	MTT Test, interspezifischer Vergleich der mit Endorem <sup>®</sup> markierten Zellen (+ E)	92
Abb. 69	Life Cell Imaging Hd 4/13, Regressionsgraden (+ E) (- E)	94
Abb. 70	Life Cell Imaging Hd 6/13, Regressionsgraden (+ E) (- E)	95

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 71	Life Cell Imaging Hd 7/13, Regressionsgraden (+ E) (- E)	95
Abb. 72	Life Cell Imaging Hd 11/13, Regressionsgraden (+ E) (- E)	95
Abb. 73	Life Cell Imaging Hd 16/13, Regressionsgraden (+ E) (- E)	96
Abb. 74	Life Cell Imaging, Wachstumskurve (- E), interspezifischer Vergleich	97
Abb. 75	Life Cell Imaging, Wachstumskurve (+ E), interspezifischer Vergleich	98
Abb. 76	TEM Hd 4/13 +E, Zellabschnitt mit Zellkern und Endorem <sup>®</sup> Einlagerungen im Zytoplasma	101
Abb. 77	TEM Hd 4 /13 + E, Vergrößerung aus der Abb. 76	101
Abb. 78	TEM Hd 4 /13 – E, elektronendichte Einlagerungen im Zytoplasma	101
Abb. 79	TEM Hd 4/13 – E, Vergrößerung der Abb. 78	101
Abb. 80	TEM Hd 4/13 + E, frei im Zytoplasma befindliche Endorem <sup>®</sup> -Cluster	102
Abb. 81	TEM Hd 4/13 + E, Vergrößerung der Abb. 80	102
Abb. 82	TEM Hd 6/13 + E, Lysosomen mit Endorem <sup>®</sup> - Partikel	102
Abb. 83	TEM Hd 6/13 + E, Endorem <sup>®</sup> - Clustern	102
Abb. 84	TEM Hd 7/13 – E, elektronendichte homogene Einlagerungen	103
Abb. 85	TEM Hd 7/13 + E, Endorem <sup>®</sup> - Cluster	103
Abb. 86	TEM Hd 11/13 + E, Querschnitt einer Zelle mit Zellkern, strangförmige Cluster von Endorem <sup>®</sup> - Partikeln	103
Abb. 87	TEM Hd 11/13 + E, strangförmiges Endorem <sup>®</sup> -Cluster	103
Abb. 88	TEM Hd 11/13 + E, Endorem <sup>®</sup> - Partikel innerhalb eines Lysosoms	104
Abb. 89	TEM Hd 11/13 + E, Endorem <sup>®</sup> - Cluster im Zytoplasma	104
Abb. 90	TEM Hd 16 /13 + E, Endorem <sup>®</sup> - Partikel innerhalb eines Residualkörpers	104

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 91	MRT, Knie 19, T2 3D FFE sagittal Schnitt mit Defekt	106
Abb. 92	MRT, Knie 19, PDW sagittal Schnitt, klar begrenzter Defekt im Femurkondylus	106
Abb. 93	MRT, Knie 22 T2 3D FFE sagittal Schnitt. kreisrunde Luftblasen innerhalb des Defektes	106
Abb. 94	MRT, Knie 22, transversale 3D WATS Aufnahme. Luftblasen innerhalb des Implantates	106
Abb. 95	MRT, Knie 23, T2 3D FFE gewichteter sagittal Schnitt. inkomplette Füllung des Defektes durch das Implantat, sowie eine Signalabschwächung im proximalen Bereich	107
Abb. 96	MRT, objektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der normierten Einzelmesswerte in der T2	108
Abb. 97	MRT, objektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der Mittelwerte für die verwendeten Zellmengen bezogen auf die T2 – gewichteten Sequenz	109
Abb. 98	MRT subjektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der normierten Einzelmesswerte in der T2	110
Abb. 99	MRT subjektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der Mittelwerte für die verwendeten Zellmengen bezogen auf die T2 – gewichteten Sequenz	111
Abb. 100	Zellkultur nach Auswachsen aus dem Gel > 100 h.	112
Abb. 101	Zellkonglomerat im ehemaligen Pellet Bereich (è)	112
Abb. 102-113	Probe Hd 16/13, Zellauswanderung aus Gel Pellet im Life Cell Imaging, T = 0 h bis T = 80 h	113- 115
Abb. 114-122	Probe Hd 11/13, Zellauswanderung aus Gel Pellet im Life Cell Imaging, T = 0 h bis T = 48 h	116- 118
Abb. 123-136	Probe Hd 4/13, Zellauswanderung aus Gel Pellet im Life Cell Imaging, T = 0 h bis T = 100 h	118- 121
Abb. 137-140	Zytotoxizitätstest im Life Cell Imaging	122- 123

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 141	MTT Vergleichstest, Zellpopulation Hd 4/13	128
Abb. 142	MTT Vergleichstest, Zellpopulation Hd 11/13	128
Abb. 143	MTT Vergleichstest, Zellpopulation Hd 16/13	129
Abb. 144	MTT Vergleichstest, interspezifischer Vergleich der mit Lösungsmittel (LM) und DMEM inkubierten Zellen.	130
Abb. 145	MTT Vergleichstest, interspezifischer Vergleich mit DMEM inkubierten Zellen.	130
Abb. 146	MTT Vergleichstest, interspezifischer Vergleich der mit Standard - Zellkulturmedium inkubierten Zellen.	131

## Tabellenverzeichnis

### Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Übersichtstabelle Einteilung von häufig verwendeten MR Kontrastmitteln ( <i>Quellen: Josephson et al. 1988, Fahlvik et al. 1993, Hamm et al. 1994, Reiser und Semmler 2002, Edelman et al. 2006, Rummeny et al. 2006, Weishaupt et al. 2009, Westbrook et al. 2011</i> )	22-23
Tabelle 1.1	T1 – und T2 – Kontrastmittel	22
Tabelle 1.2	Extrazelluläre und intrazelluläre Kontrastmittel	23
Tabelle 1.3	Spezifische Kontrastmittel	23
Tabelle 2	Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem® ( <i>Wissenschaftliche Information Endorem®, Guerbet</i> )	25
Tabelle 3	Übersichtstabelle, Differenzierungspotenzial von Stammzellen ( <i>modifiziert nach Kühl u. Kühl 2012</i> )	28
Tabelle 4	Implantat, Gel - Zusammensetzung und Zell - Konzentrationen	67
Tabelle 5	Aufteilung der Fettgewebeproben, Konzentrationen und der Kniegelenke als randomisiertes Blockdesign	69
Tabelle 6	Übersicht über die ausgewählten Sequenzparameter	71
Tabelle 7	Zellauswanderung aus dem Gelpellet, Übersichtstabelle	75
Tabelle 8	Messwerte MTT Test, Einzelmesswerte, Mittelwerte, Standard Abweichung, Tag 0 -3	86-87
Tabelle 8.1	Hd 4/13	86
Tabelle 8.2	Hd 6/13	86
Tabelle 8.3	Hd 7/13	87
Tabelle 8.4	Hd 11/13	87
Tabelle 8.5	Hd 16/13	87

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 9	MTT Test, $D_1$ Werte der neg. Kontrolle (- E) für alle Zellpopulationen	87
Tabelle 10	MTT Test, $D_1$ Werte der Endorem <sup>®</sup> markierten (+ E) Zellen für alle Zellpopulationen	88
Tabelle 11	MTT Test, Steigung m der Regressionsgeraden, Determinationskoeffizient $r^2$ , sowie Delta aus m, $D_m$	88
Tabelle 12	Life Cell Imaging, Flächenberechnung Freifläche, Mittelwerte über die Zeit für alle Zelllinien (+ E) (- E)	93
Tabelle 13	Life Cell Imaging, Steigung m der Regressionsgeraden, Determinationskoeffizient $r^2$ , sowie Delta aus m, $D_m$	94
Tabelle 14	MRT, objektive Messung, Mittelwerte, Standardabweichung der T2 Sequenz	108
Tabelle 15	MRT, subjektive Messung, Mittelwert, Standardabweichung, der T2 Sequenz	110
Tabelle 16	Messwerte MTT Vergleichstest, Dreifachmessung der Absorption über Tag 0 – 3, Mittelwerte, Standardabweichungen Wert.	124- 125
Tabelle 16.1	Hd 4/13, Messwerte MTT Vergleichstest	124
Tabelle 16.2	Hd 11/13, Messwerte MTT Vergleichstest	124
Tabelle 16.3	Hd 16/13, Messwerte MTT Vergleichstest	125
Tabelle 17	MTT Vergleichstest, $D_1$ Werte der verwendeten Zellpopulationen	125- 126
Tabelle 17.1	Hd 4/13	125
Tabelle 17.2	Hd 11/13	125
Tabelle 17.3	Hd 16/13	126
Tabelle 18	MTT Vergleichstest, Steigung m der Regressionsgeraden, Determinationskoeffizient $r^2$	126
Tabelle 19	MTT – Vergleichstest, Delta m	126



## 1 Einleitung

Die Osteochondrose am Kniegelenk des Hundes stellt ein aktuelles therapeutisches Problem in der veterinärmedizinischen Praxis dar (Olsson 1993, Jackson et al. 2001, Thiede et al. 2012). Neuartige Therapiemöglichkeiten wie die Implantation von mesenchymalen Stammzellen in den bestehenden Knorpeldefekt könnten die Prognose des erkrankten Gelenkes verbessern und eine gute, annähernd normale Funktionalität für den Patienten ermöglichen (Jackson et al. 2001, Liu et al. 2002, Guo et al. 2004, Thiede et al. 2012).

Die Integration von mesenchymalen Stammzellen in ein synthetisches Trägermaterial soll nach Angaben von zahlreichen Studien zu einem Hyalin ähnlichen Knorpel mit hohem Anteil an Kollagen Typ II und Proteoglycanen führen (Jackson et al. 2001, Liu et al. 2002, Guo et al. 2004, Trzeciak et al. 2006, Thiede et al. 2012). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft ist ein derartiges Behandlungskonzept zwar vielversprechend, zahlreiche Untersuchungen zu Wirkungsweise und Verbleib der implantierten Zellen stehen jedoch noch aus (Tobias et al. 2012, Kon et al. 2012).

Ziel der folgenden Studie ist der magnetresonanztomographische Nachweis von Kontrastmittel (Endorem®) markierten mesenchymalen Stammzellen innerhalb einer komplexen anatomischen Struktur wie dem Kniegelenk des Hundes. Anhand des Beispiels der Osteochondrose soll in einem Modellversuch gezeigt werden, dass es möglich ist, markierte Zellen nach der chirurgischen Implantation in der nicht invasiven MRT Untersuchung zu detektieren. Im Speziellen gilt es zu klären, ob der Nachweis der eingebrachten Zellen mittels eines 1 Tesla Tomographen Konzentrationsabhängig durchführbar ist. In vivo Untersuchungen wie diese würden weitere wissenschaftliche Untersuchungen zum Verbleib und der biologischen Aktivität der Zellen nach Implantation in den lebenden Organismus ermöglichen und einen bedeutenden Schritt in der mesenchymalen Stammzellforschung darstellen. Im Sinne der klinischen Durchführbarkeit werden für den Versuch aus dem Fettgewebe gewonnene Stammzellen verwendet. Diese scheinen sich auf Grund ihrer einfachen Entnahmemöglichkeiten und ihres vielfältigen Differenzierungspotenzials besonders für ein standardisiertes Therapiekonzept zu eignen.

Einen weiteren Schwerpunkt setzt diese Arbeit auf die Untersuchung zur Markierungseffizienz sowie die Verträglichkeit der Endorem® - Markierung. Es

## 1 Einleitung

werden Tests zur Vitalität, dem Proliferationsverhalten und der Migrationsfähigkeit der Zellen durchgeführt. Ergänzende Untersuchungen im Labor sollen weitere Informationen über die Verarbeitung, Verträglichkeit und Eignung des kollagenen Trägermaterials für den klinischen Einsatz erbringen. Primäres Ziel dieser Arbeit ist die Zusammenführung der teils theoretischen Forschung aus dem Zelllabor mit der realistischen Umsetzung in einem wissenschaftlich basierten Therapiekonzept in der zukünftigen alltäglichen klinischen Orthopädie beim Hund.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Magnetresonanztomographie

#### 2.1.1 Einleitung

Die Geschichte des Magnetismus lässt sich auf erste schriftliche Dokumentationen ab 500 v.Chr. in der chinesischen Kultur zurückverfolgen. Während es sich zu dieser Zeit oftmals um Beschreibungen von magnetischen Phänomenen handelt, beginnen die Menschen im 11. Jahrhundert nachweislich sich die magnetischen Kräfte zunutze zu machen. Die Entdeckung der Kompassnadel brachte große Fortschritte in der Navigation. Der Magnetismus erhielt eine zentrale Rolle in der wissenschaftlichen Forschung, während zugleich Aberglaube und Magie immer weiter in den Hintergrund rückten (Mihaljevic et al. 2009). Die ersten Einsätze der Magnetresonanztomographie (MRT) in der Humanmedizin gehen auf die siebziger Jahre zurück. Raymond V. Damadian beschreibt 1971 die unterschiedlichen Relaxationszeiten von gesundem gegenüber tumorös verändertem Gewebe. Im Jahre 2003 erhalten Paul Lauterbur und Sir Peter Mansfield den Nobelpreis für ihre Forschung um die Magnetresonanztomographie in den siebziger Jahren (Geva 2006, McRobbie et al. 2007, Mihaljevic et al. 2009).

#### 2.1.2 Klinischer Einsatz

Die MRT stellt eine entscheidende Rolle in der Routinediagnostik der Humanmedizin dar. Heutzutage verwendet man in der klinischen Praxis Magneten mit einer Feldstärke von bis zu 3 Tesla oder sogar mehr. Verschiedenste Spezialspulen helfen dem Untersucher, hohe Bildqualität bei niedrigen Akquisitionszeiten zu gewährleisten (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Mihaljevic et al. 2009). Auch in Tierkliniken steht eine breite Auswahl verschiedenster bildgebender Verfahren, darunter auch die MRT, als Routinediagnostikum zur Verfügung (Mihaljevic et al. 2009, Adamiak et al. 2011). Die MRT macht sich die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften verschiedener Gewebe zunutze. Die Möglichkeit der dreidimensionalen Bildgebung, eine präzise anatomische Darstellung und ein hoher Kontrast stellen wichtige Vorteile gegenüber anderen bildgebenden Verfahren dar (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Foltin et al. 2004, Blond et al. 2008). Orthopädische und neurologische Erkrankungen stellen sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin die Hauptindikationsgebiete der Kernspintomographie dar.

## 2 Literaturübersicht

Speziell in der Gelenkdiagnostik zeigt die MRT im Vergleich zu anderen Methoden einen hervorragenden Weichteilkontrast (Baird et al. 1998, Foltin et al. 2004, Konar et al. 2005 (a, b), Gavin et al. 2009, Mihaljevic et al. 2009).

Widmer und Mitarbeiter beschreiben 1991 als erste die magnetresonanztomographische Darstellung des kaninen Kniegelenkes.

Baird und Mitarbeiter (1998) visualisieren in einer Studie über das kanine Kniegelenk die Kreuzbänder und Menisken mit einem 0,064 Tesla Scanner. Im Jahre 2000 dokumentieren Banfield und Morrison den klinischen Einsatz der MRT - Arthrographie am Hund im 1,5 Tesla Hochfeld - Scanner. Strukturen wie das kraniale Kreuzband, Kollateralbänder und Menisken können in dieser Arbeit mit und ohne Kontrastmittel sicher identifiziert werden. Die MRT ist im Vergleich zu anderen Verfahren die einzige nichtinvasive Methode, die prinzipiell in der Lage ist, hyalinen Gelenkknorpel abzubilden (Widmer et al. 1994, Baird et al. 1998, Recht et al. 2001, Konar et al. 2005 (a), Boileau et al. 2008). Speziell T2 - oder PD - gewichtete Sequenzen mit Fettsättigung und möglichst hoher Auflösung eignen sich bei Geräten ab mindestens 1,0 Tesla, um Veränderungen der Knorpeloberfläche darzustellen. In den genannten Sequenzen zeigt sich hyaliner Gelenkknorpel in physiologischer Form als ein intermediäres bis signalreiches, homogenes, schmales Band, welches der größtenteils signalfreien Kortikalis direkt anliegt (Foltin et al. 2004). Strukturveränderungen innerhalb des Knorpels sind durch fokale oder lineare Signalerhöhungen gekennzeichnet. Eine Knorpeldegeneration führt zum Wasserverlust innerhalb des Gewebes und zu einem Signalabfall (Signal mittlerer Intensität) in der MRT. In der Studie von Konar und Mitarbeitern (2005) kann in 90 % der Fälle (80 Kniegelenke) der femorotibiale Knorpelüberzug auch mit einem Niederfeldgerät dargestellt werden.

Schwierigkeiten bei der Interpretation von Gelenkknorpel treten jedoch auf Grund seines sehr dünnen Durchmessers auf (Foltin et al. 2004). Studien, die den sicheren Nachweis von Knorpelläsionen im Kniegelenk von Kleintieren mittels MRT nachweisen, liegen bisher noch nicht vor. Besonders die geringe Auflösung der Niederfeldsysteme und das Fehlen einer phasenselektiven Fettunterdrückung erschweren die Beurteilung des Gelenkes. Knorpelschäden können in diesen Systemen deshalb nach Foltin und Mitarbeitern (2004) nur durch sekundäre Befunde im fortgeschrittenen Fall erkannt werden. Beschrieben wird beispielsweise eine mediale Signalerhöhung bei der Chondropathia patellae, eine Ausdünnung der

## 2 Literaturübersicht

Kompakta und eine unscharf begrenzte subchondrale Signalerhöhung, die typischerweise bei aktivierten Arthrosen zu finden ist (Foltin et al. 2004).

### 2.1.3 Physikalische Grundlagen

#### 2.1.3.1 Protonen im Magnetfeld

Die Grundlage für die Entstehung von magnetresonanztomographischen Aufnahmen bilden die im Körper zahlreich vorkommenden Wasserstoffatome. Ein Wasserstoffatom besteht aus einem Proton und einem darum kreisenden Elektron in der Hülle. Der Atomkern beschreibt eine Drehung um sich selbst, welche als Spin bezeichnet wird (Abbildung 1).

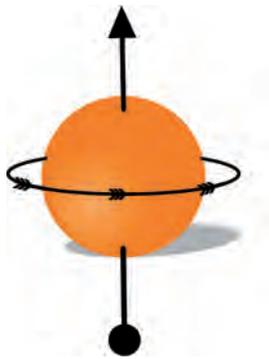


Abb. 1  
Das Proton beschreibt eine Drehung um sich selbst, den Spin.  
(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)

Der Spin ist eine Grundeigenschaft der Elementarteilchen und somit stoffspezifisch immer gleich stark ausgeprägt (gyromagnetisches Moment  $\gamma$ ) (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

Durch die Rotation der Masse hat das Proton einen eigenen Drehimpuls und durch die Rotation der positiven elektrischen Ladung entsteht ein magnetisches Moment  $B$ . Besitzt ein Atomkern eine gerade Anzahl an Protonen, heben sich parallel und antiparallel gerichtete Spins der Protonen auf und die Summe des magnetischen Momentes ist null (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

Auf Grund seiner hohen Konzentration im körpereigenen Wasser und Fettgewebe und seines großen magnetischen Kernmomentes steht das Wasserstoffatom im Gegensatz zu anderen wie beispielsweise Fluor (mit 9 Protonen) und Natrium (mit 11 Protonen) im Fokus der medizinischen Magnetresonanztomographie (Bushberg et al.

## 2 Literaturübersicht

2002, Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006). Ohne die Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes positionieren sich die Vektoren der Spins zufällig im Raum und es kommt zur Aufhebung der Vektoren, das magnetische Moment beträgt null (Abbildung 2) (Gomori u. Grossman 1988, Reiser u. Semmler 2002, Edelmann et al. 2006, Westbrook et al. 2011).

Bringt man das Proton nun in ein äußeres homogenes Magnetfeld  $B_0$ , richten sich die Spins unter Abgabe von Energie parallel bzw. antiparallel zu  $B_0$  aus und die Vektoren addieren sich zur Längsmagnetisierung  $M_z$  (Abbildung 3). Die Vektorsumme ( $M_z$ ) steht hierbei im unmittelbaren Zusammenhang mit der Stärke von  $B_0$ . Bei einer Feldstärke  $B_0$  von 1 Tesla (bei 37 °C) beträgt das Verhältnis von energetisch günstigeren parallelen zu antiparallelen Spins 1.000.007 / 1.000.000 (Edelman et al. 2006, Weishaupt et al. 2009).

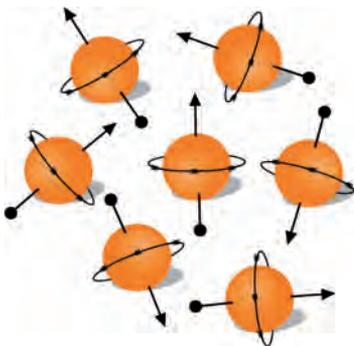


Abb. 2  
Die Vektoren der Spins positionieren sich zufällig im Raum und die Summe ihres magnetischen Momentes beträgt null.  
(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)

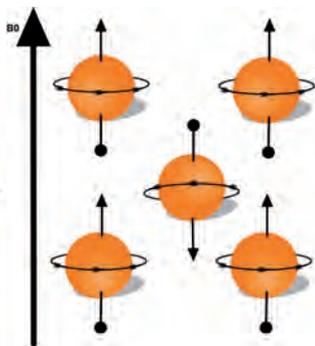


Abb. 3  
Unter Einwirkung eines äußeren homogenen Magnetfeldes  $B_0$  richten sich die Spins parallel und antiparallel in Richtung  $B_0$  aus und erzeugen die Längsmagnetisierung  $M_z$ .  
(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)

Des Weiteren kommt es unter Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes zu einer Ausweichbewegung der rotierenden Protonen. Die positiven Teilchen präzessieren senkrecht zur Ebene von  $B_0$ . Die Präzessionsfrequenz ist hierbei proportional zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  und wird als Larmorfrequenz  $\omega_0$  bezeichnet (Abbildung 4) (Gomori u. Grossman 1988, Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

## 2 Literaturübersicht

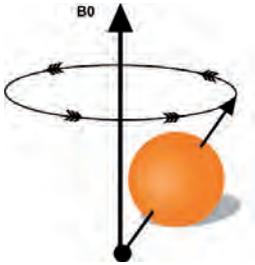


Abb. 4  
Unter Einfluss des äußeren Magnetfeldes  $B_0$  beschreibt das Proton eine Ausweichbewegung (Präzessionsbewegung) senkrecht zur Ebene von  $B_0$ .  
(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)

Um ein auswertbares MRT Signal zu erhalten, benötigt man eine Anregung dieses Spin - Systems. Dies erfolgt durch das Einbringen einer elektromagnetischen Welle, die von ihrer Frequenz mit der Larmorfrequenz der Präzessionsbewegung übereinstimmt (Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006, Westbrook et al. 2011). Die eingebrachte Energie bewirkt ein Herauskippen der Spins aus der  $B_0$  Ebene. Unter Einfluss eines  $90^\circ$  Impulses (Hochfrequenzimpuls) wird die Längsmagnetisierung  $M_z$  vollständig in eine Transversalmagnetisierung  $M_{xy}$  umgewandelt (Abbildung 5) und die Empfangsspule detektiert eine Wechselspannung mit der vorliegenden Larmorfrequenz (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

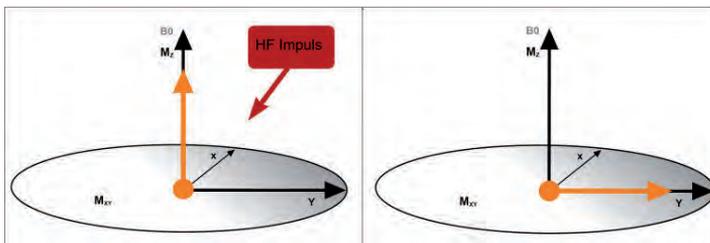


Abb. 5  
Die in Richtung  $B_0$  ausgerichtete Längsmagnetisierung  $M_z$  (gelber Pfeil) wird durch das Einbringen eines Hochfrequenzimpulses (HF Impuls) vollständig in die XY Ebenen gekippt. Es entsteht die Transversalmagnetisierung  $M_{xy}$ .  
(modifiziert nach Bushberg et al. 2002)

Eine weitere Folge des HF Impulses ist die Synchronisation der Präzessionsbewegung der angeregten Protonen. Diese befinden sich kurz nach der Anregung im Zustand der Phasenkohärenz und ihre Vektoren addieren sich maximal zur Summe der transversalen Magnetisierung  $M_{xy}$  (Abbildung 6) (Bushberg et al. 2002).

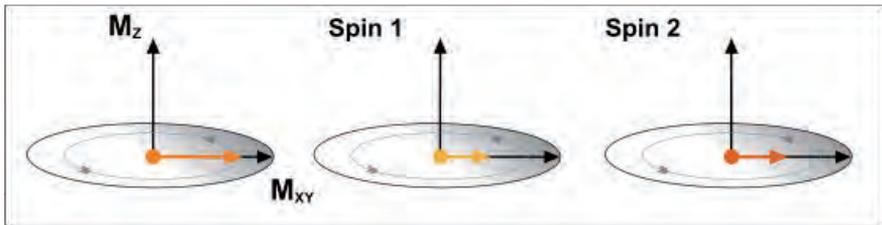


Abb. 6

Die Vektoren der Präzessionsbewegungen einzelner Spins, hier beispielhaft Spin 1 und Spin 2, addieren sich zum Vektor der transversalen Magnetisierung  $M_{xy}$ .

(modifiziert nach Bushberg et al. 2002)

Im Anschluss an einen Hochfrequenzimpuls kommt es im zeitlichen Verlauf wieder zum Absinken des Empfangsspulensignales. Die angeregten Wasserstoffatome kehren in ihren stabilen Ausgangszustand zurück. Der Abfall des Signales erklärt sich durch die Wechselwirkung zweier parallel ablaufender Vorgänge (Reiser u. Semmler 2002, Weishaupt et al. 2009, Westbrook et al. 2011).

### 2.1.3.2 T1 - Relaxation

Zum einen erfolgt eine Spin - Gitter Relaxation (longitudinale Relaxation), in der die angeregten Spins ihre erworbene Energie zurück an das Gitter abgeben und aus der XY - Ebene in Richtung  $B_0$  (Z - Ebene) zurückkehren (Abbildung 7) (Bushberg et al. 2002). Die hierfür benötigte Zeit wird durch die T1 - Zeit beschrieben. Sie ist von dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  und der molekularen Struktur des Gewebes abhängig. Die Zunahme von  $M_z$  über die Zeit stellt eine Exponentialfunktion dar (Abbildung 8). Bei einem äußeren Magnetfeld von beispielsweise 1,5 Tesla beträgt sie für unterschiedliche Gewebe zwischen 100 Millisekunden bis hin zu mehreren Sekunden (Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

## 2 Literaturübersicht

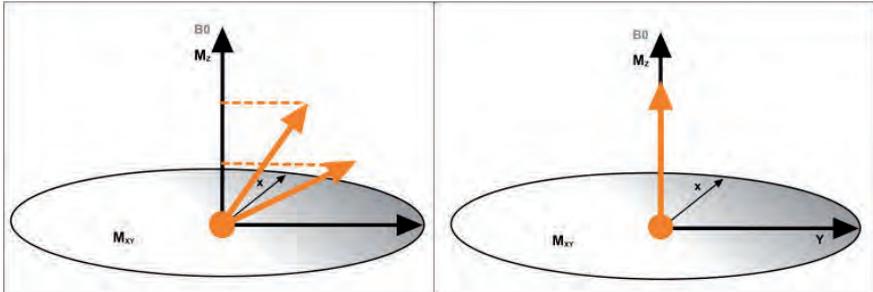


Abb. 7

T1 / Longitudinale Relaxation: Die angeregten Spins kippen unter Abgabe von Energie an das umgebende Gitter zurück in die  $B_0$  Ebenen. Die transversale Magnetisierung  $M_{XY}$  nimmt unter Zunahme der longitudinalen Magnetisierung  $M_z$  über die Zeit ab, bis sie wieder vollständig in diese umgewandelt ist.

(modifiziert nach Bushberg et al. 2002)

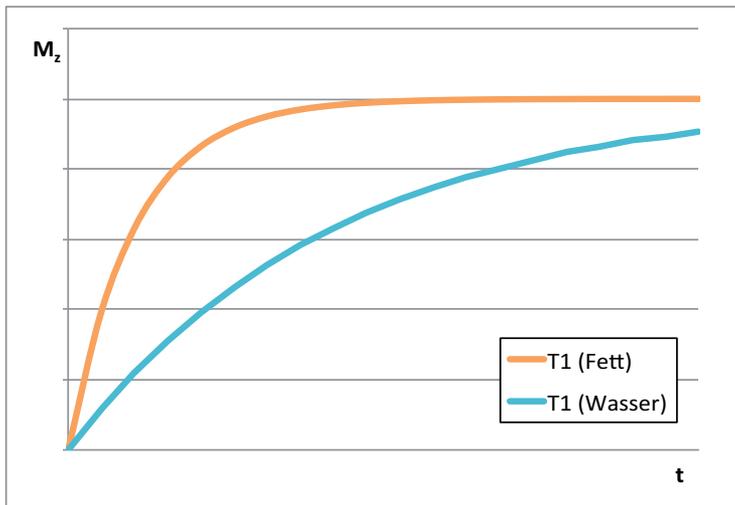


Abb. 8

Verlaufskurven der longitudinalen Relaxation am Beispiel Fett und Wasser. Nach der Anregung durch einen  $90^\circ$  Impuls relaxiert  $M_{XY}$  gegen  $M_z$ .

T1 = longitudinale Relaxationszeit;  $M_z$  = longitudinale Magnetisierung;  $t$  = Zeit;  $M_{XY}$  = transversale Magnetisierung

(modifiziert nach Reiser u. Semmler 2002)

### 2.1.3.3 T2 - Relaxation

Zeitgleich kommt es zu einer Spin - Spin Relaxation (transversale Relaxation), in der die Spins ihre Energie untereinander austauschen. Während dieser Relaxation geht die nach der Anregung vorliegende Phasenkohärenz verloren. Die Spins werden durch das lokal schwankende, von den benachbarten rotierenden Spins ausgehende Magnetfeld in ihrer Präzession beeinflusst und dephasieren. Der Summenvektor der jetzt zum Teil gegensätzlichen Vektoren in der transversalen Ebene nimmt ab, welches sich in einer sinkenden transversalen Magnetisierung  $M_{XY}$  in der Empfangsspule widerspiegelt (Abbildung 9). Dieser Teil des Signalabfalles wird durch die T2 - Zeit charakterisiert und ist abhängig von der Gewebezusammensetzung, jedoch unabhängig von  $B_0$ .  $M_{XY}$  fällt somit exponentiell über die Zeit ab (Abbildung 10). Die T2\* - Zeit beschreibt die T2 - Zeit, in der zusätzlich zu den genannten Parametern der Einfluss der Inhomogenitäten des Magnetfeldes durch den Tomographen und den Untersuchungskörper mit einbezogen werden (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002). Übliche T2 - Zeiten liegen im Rahmen von 10 – 1000 Millisekunden (Reiser u. Semmler 2002). Die T2 - Relaxation führt somit noch vor dem Wiederaufbau der longitudinalen Magnetisierung  $M_z$  zu einem Verlust der transversalen Magnetisierung  $M_{XY}$  (Weishaupt et al. 2009).

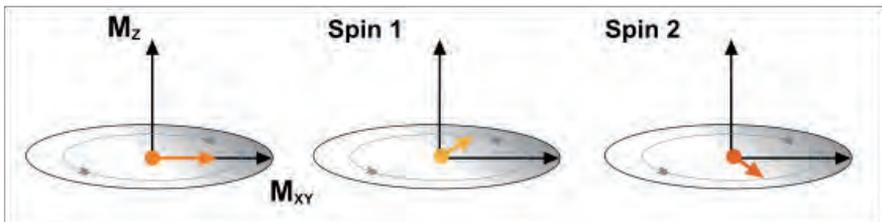


Abb. 9

T2 / Transversale Relaxation: Durch den Austausch der Energie unter den Spins geht die zu Beginn bestehende Phasenkohärenz verloren. Die Vektorsumme  $M_{XY}$  (transversale Magnetisierung) verringert sich über die Zeit.

(modifiziert nach Bushberg et al. 2002)

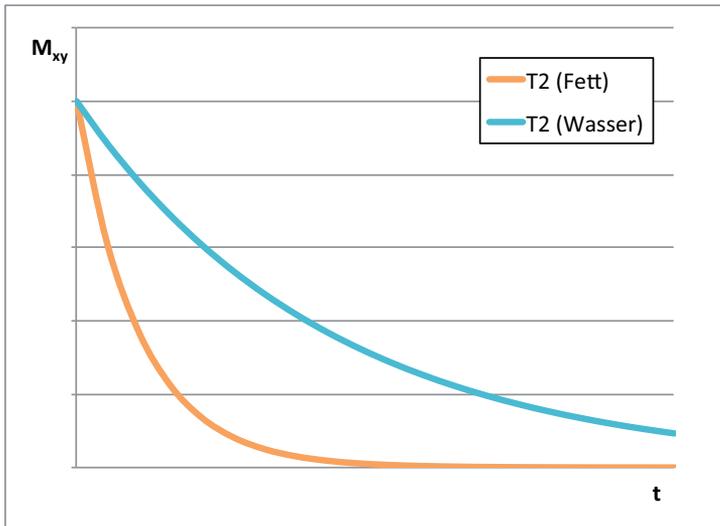


Abb. 10

Verlaufskurven der transversalen Relaxation am Beispiel Fett und Wasser. Nach der Anregung durch einen  $90^\circ$  Impuls relaxiert die transversale Magnetisierung  $M_{xy}$  gegen 0.

$M_{xy}$  = transversale Magnetisierung; T2 = transversale Relaxationszeit; t = Zeit  
(modifiziert nach Reiser u. Semmler 2002)

### 2.1.3.4 Bildkontrast in der MRT

Der Bildkontrast in der MRT hängt im Wesentlichen von der Protonendichte eines Gewebes, sowie dessen T1 - und T2 - Zeit ab. Die Protonendichte bestimmt das maximal erreichbare Signal, das vom Gewebe reflektiert werden kann. Die Zeit der longitudinalen Relaxation (T1) gibt Aufschluss über den Zeitpunkt, an dem ein Proton wieder erregbar ist. Das Abklingen des Signales nach der Anregung wird durch die transversale Relaxation (T2) beschrieben. Jeder dieser Parameter kann speziell in den Aufnahmen in den Vordergrund gehoben werden, so dass Bilder mit verschiedenem Gewebekontrast erzeugt werden können (Reiser u. Semmler 2002, Weishaupt et al. 2009).

### 2.1.3.5 Repetitionszeit (TR)

Die Gewebeschichten eines Körpers müssen viele Male angeregt werden, um ein auswertbares MRT Signal zu erhalten. Die Zeit zwischen den Anregungen durch einen Hochfrequenzimpuls bezeichnet man als Repetitionszeit (TR). Die Repetitionszeit entscheidet über den Grad der wieder zurück erlangten

## 2 Literaturübersicht

Längsmagnetisierung  $M_z$  und wirkt sich somit auch auf das folgende Signal aus. Je länger die Zeit zwischen den Impulsen ist, desto größer ist die bereits zurück erlangte Längsmagnetisierung und mit dieser verstärkt sich das folgende Signal im Anschluss an eine erneute Anregung (Reiser u. Semmler 2002, Weishaupt et al. 2009). Mit einer langen TR erhält man somit keine Informationen über die T1 Werte, da alle Gewebe in der Messung eine ähnliche Intensität aufweisen. Bei kurz gewählter Repetitionszeit hingegen, erzeugen Gewebe mit kleiner T1 (z.B. Fett) (Abbildung 8) ein stärkeres Signal und stellen sich hell bzw. hyperintens dar. Gewebe mit langer T1 (z.B. Wasser) (Abbildung 8) erscheinen in dieser Wichtung dunkel bzw. hypointens, da ihre T1 - Relaxation zum Zeitpunkt der erneuten Anregung noch unvollständig vorliegt (Bushberg et al. 2002, Westbrook et al. 2011). Um T1 gewichtete Bilder (Bilder mit T1 Kontrast) zu erzeugen, muss daher eine kurze Repetitionszeit (TR) (max. 400 - 750 Millisekunden) gewählt werden (Bushberg et al. 2002, McRobbie et al. 2007).

### 2.1.3.6 Echozeit (TE)

Die Echozeit (TE) beschreibt die Zeitspanne zwischen Impulsanregung und Messung des vom Gewebe ausgehenden Signales (Echo). Direkt nach der Anregung ist das empfangene Signal hoch, die Spins präzessieren in Phase und addieren sich zum Summenvektor  $M_{xy}$ . Erfolgt eine Messung zu einem späteren Zeitpunkt (lange TE) sind je nach Gewebeeigenschaften schon einige Spins außer Phase geraten und die transversale Magnetisierung  $M_{xy}$  nimmt ab. Messungen mit langer Echozeit (TE) sind somit T2 gewichtet, da in diesen unterschiedliche T2 - Zeiten zu einer sichtbaren Signalveränderung im MRT - Bild führen (Bushberg et al. 2002, McRobbie et al. 2007, Westbrook et al. 2011). Gewebe mit großer T2, wie beispielsweise Wasser (Abbildung 10) geben somit bei lang gewählter Echozeit noch viel Signal an die Empfangsspule ab. Sie haben somit ein hyperintenses Erscheinungsbild (Mihaljevic et al. 2009, Westbrook et al. 2011).

### 2.1.3.7 Protonendichte gewichtete Bilder

Zur besonderen Betonung der Protonendichte eines Gewebes muss die TR lang und die TE kurz gewählt werden (Mihaljevic et al. 2009, Weishaupt et al. 2009). T1 und T2 Relaxationsvorgänge beeinflussen die Messung somit nur in einem geringen Maße. Diese Art der Messung wird bevorzugt für Gewebe mit geringer

## 2 Literaturübersicht

Signalintensität, wie beispielsweise Sehnen oder Knochen, verwendet. Ein Großteil der Spins ist bei erneuter Anregung bereits zu seiner Längsmagnetisierung zurückgekehrt und es kommt zu einem ausgeprägten Folgesignal. Das Signal wird noch vor Abklingen durch außer Phase geratene Spins ausgelesen, so dass im Resultat maximale Signalwerte für die vorhandenen Protonen erreicht werden können (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

### 2.1.3.8 Sättigung

Sättigung bedeutet, dass bei einer Messung mit kurzer Repetitionszeit (TR) bei jeder Messung weniger Signal erhalten wird. Die longitudinale Relaxation ist noch unvollständig und die Spins besitzen nur wenig Längsmagnetisierung  $M_z$  zum Zeitpunkt der folgenden Impulsanregung. Ein schwaches Signal führt zu einer schlechten Bildqualität und somit zu nicht auswertbaren Aufnahmen (Weishaupt et al. 2009).

### 2.1.3.9 Pulswinkel und Vorsättigung

Um einer Sättigung bei kurzer TR entgegen zu wirken, wählt man einen reduzierten Pulswinkel ( $< 90^\circ$ ). Ein Teil der Längsmagnetisierung  $M_z$  bleibt somit erhalten und steht für die nächsten Anregung zur Verfügung (Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

Um den Bildkontrast von T1 gewichteten Bildern zu verbessern, verwendet man ebenfalls Vorpulse (Vorsättigung). Diese  $90^\circ$  - oder  $180^\circ$  - Impulse werden noch vor Beginn der eigentlichen Messung zur Anregung der Spins verwendet. Bei einem  $180^\circ$  - Impuls kommt es zu einer Inversion der Längsmagnetisierung  $M_z$  und resultierend zu einer Vergrößerung des Kontrastbereiches (- 1 bis + 1). Entscheidend für die anschließende Messung ist ebenfalls die Zeit zwischen Vorimpuls und Anregungsimpuls (Inversionszeit TI). Mit der richtigen Wahl der Inversionszeit können bestimmte Gewebe anhand ihrer T1 - Relaxationszeit unterdrückt werden, da sie zum Zeitpunkt des Anregungsimpulses gerade keine Längsmagnetisierung  $M_z$  aufweisen (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

### 2.1.3.10 Ortskodierung

Die Bildrekonstruktion kann nur erfolgen, wenn exakte Informationen über die Herkunft des Echosignales vorausgesetzt werden können. Die Ortskodierung im Magnetresonanztomographen basiert auf der Verwendung von verschiedenen Magnetfeldgradienten in X -, Y - und Z - Richtung (Abbildung 11) (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, McRobbie et al. 2007, Westbrook et al. 2011).

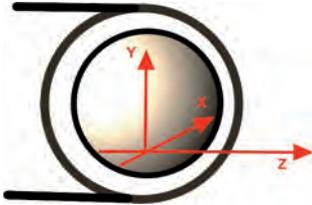


Abb. 11  
Schematische Darstellung der XYZ Ebenen innerhalb des Magnetresonanztomographen.

Entscheidende Voraussetzung ist, dass sich die Larmorfrequenz der Spins immer proportional zur Magnetfeldstärke verhält und eine Anregung nur bei identischer Anregungsfrequenz (Resonanz) möglich ist (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

### Z - Richtung

Um den Untersuchungskörper in Schichten zu unterteilen, verwendet man in Z - Richtung zusätzlich zum Hauptmagnetfeld Gradientenspulen, die zu einer Varianz des  $B_0$  Feldes entlang des Magnetresonanztomographen führen. Diese Varianz des Magnetfeldes in Z - Richtung ist in der Regel linear ansteigend. Je nach Stärke des Gradienten variiert die zur Anregung verfügbare Schichtdicke (Abbildung 12) Das Frequenzspektrum des HF Impulses führt somit selektiv zur Anregung einer bestimmten Schicht. Bei einem steilen Gradienten entspricht nur eine dünne Schicht dem gewählten Frequenzintervall, während bei einem flachen Gradienten eine breite Schicht durch das Frequenzspektrum des HF Impulses angeregt wird. Die Spins weisen entlang der Z - Richtung eine unterschiedliche Larmorfrequenz auf (Abbildung 13) und können nur in einer definierten Schicht durch den Anregungsimpuls auf ein höheres Energieniveau gebracht werden (Bushberg et al. 2002, Mihaljevic et al. 2009, Westbrook et al. 2011).

## 2 Literaturübersicht

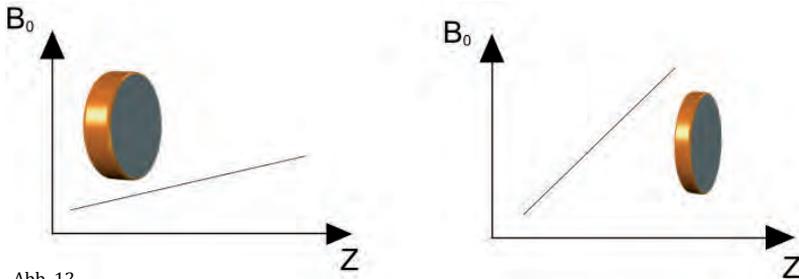


Abb. 12

Die Schichtdicke der zur Anregung zur Verfügung stehenden Protonen ergibt sich aus der Steigung des Magnetfeldgradienten in  $Z$ -Richtung. Ist der Gradient flach, wird eine breite Schicht angeregt (linkes Bild), bei einem steilen Gradienten kommt es zur Anregung einer dünneren Schicht (rechtes Bild). (modifiziert nach Westbrook et al. 2011)

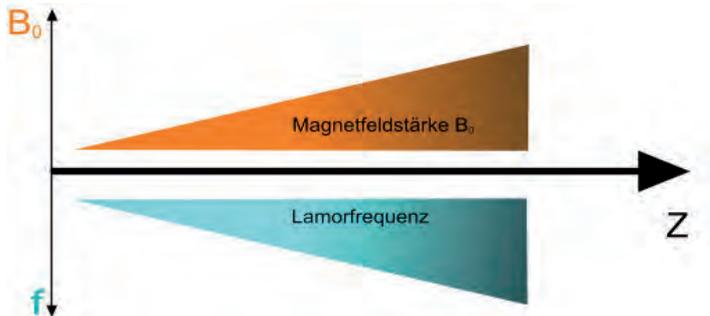


Abb. 13

Der Gradient der Magnetfeldstärke in  $Z$ -Richtung führt proportional zu einer Erhöhung der Larmorfrequenz in diesem Bereich. Eine selektive Schichtanregung in  $Z$ -Richtung ist somit möglich. (modifiziert nach Buschberg et al. 2002)

### Y - Richtung

Eine Kodierung des Signales in  $Y$ -Richtung erfolgt ebenfalls durch den Einsatz von Gradientenspulen. Nach der Anregung werden die Spins in  $Y$ -Richtung durch das kurzzeitige Einschalten einer Gradientenspule in ihrer Larmorfrequenz, in Abhängigkeit zu ihrer Position auf der  $Y$ -Achse, beeinflusst. Nach dem Abschalten dieses Gradienten besitzen die Spins in  $Y$ -Richtung wieder die gleiche Larmorfrequenz, befinden sich jedoch in einer unterschiedliche Phase der Rotation (Abbildung 14). Diese Art der Kodierung wird als Phasenkodierung bezeichnet. Um einen Punkt auf der  $Y$ -Achse genau zu bestimmen, müssen jedoch zahlreiche Durchläufe der Phasenkodierung erfolgen, da das Signal immer nur eine Auskunft

## 2 Literaturübersicht

über die Summe der Vektoren mit gleicher Frequenz geben kann. Die Aufteilung der Phasen wird im Anschluss berechnet (Fourier - Transformation) (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011).

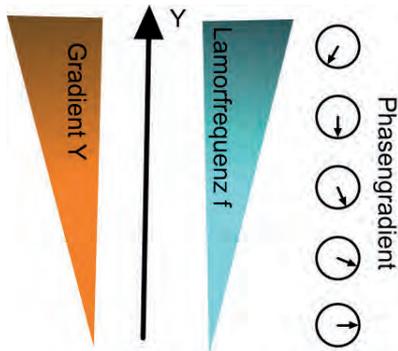


Abb. 14  
Phasenkodierung: Das Einschalten der Gradientenspule in Y - Richtung führt zu einer proportionalen Erhöhung der Larmorfrequenz. Nach Abschalten des Gradienten weisen die angeregten Protonen eine definierte Phasenverschiebung in Y - Richtung auf.  
(modifiziert nach Westbrook et al. 2011)

### **X - Richtung**

In X - Richtung wird eine Kodierung ebenfalls durch Anlegen einer Gradientenspule erzeugt. Auch hier führt der Magnetfeldgradient zu einer veränderten Larmorfrequenz, welche während der eigentlichen Messung des Signales beibehalten wird. Durch diese Frequenzkodierung wird ein Spektrum von Frequenzen als Echosignal hervorgerufen, anhand derer die Herkunft des Signales in der X - Richtung erneut mit einer zweiten Fourier - Transformation (Frequenzanalyse) berechnet werden kann (Reiser u. Semmler 2002, Weishaupt et al. 2009).

Die zeitgleiche Verwendung von Phasen - und Frequenzkodierung ermöglicht die eindeutige Charakterisierung eines Voxels (definierter Volumenbereich) im Untersuchungsgewebe (Bushberg et al. 2002, Weishaupt et al. 2009, Westbrook et al. 2011).

### 2.1.3.11 Artefakte

Artefakte beschreiben Fehler im errechneten MRT - Bild und können die Bildqualität und die daraus resultierende Auswertbarkeit stark beeinflussen. Sie können pathologische Befunde vortäuschen oder reale Gegebenheiten verbergen und stellen somit einen wichtigen Teil der Auswertung dar (McRobbie et al. 2007, Mihaljevic et al. 2009).

#### **Chemical Shift Artefakt**

Je nach Molekülbindungsort können auch gleichartige Atomkerne geringgradig unterschiedliche Resonanzfrequenzen aufweisen. Diese Abhängigkeit der Resonanzfrequenz von der molekularen Umgebung wird als Chemical Shift (Chemische Verschiebung) bezeichnet. Eine Hauptbedeutung hat dieser Effekt bei der Unterscheidung von Protonen im Wasser und Methylenprotonen in langkettigen Fettsäuren. So präzessieren die Atome bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla im Fett um 220 Hz langsamer als im Wasser. In Richtung des Frequenzgradienten werden Protonen hierbei an einem anderen Ort abgebildet als sie sich wirklich befinden. Es kommt einerseits zu einer Überlappung und andererseits zu einem Fehlen des Signales. Das resultierende Bild zeigt eine Struktur, die auf der einen Seite von einem signalarmen und auf der anderen von einem signalreichen Streifen umgeben wird (McRobbie et al. 2007, Westbrook et al. 2011).

#### **Out of Phase**

Dieses Phänomen der Magnetresonanztomographie basiert wie auch das Chemical Shift Artefakt auf der unterschiedlichen Präzissionsfrequenz von Protonen in Wasser und Fett. Während sich die Protonen direkt nach der Anregung in Phase befinden, geraten sie schon kurz danach außer Phase. Bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla kommt es nach 2,2 Millisekunden um eine Phasenverschiebung der Protonen um  $180^\circ$ . Bei Akquirierung des Signales kann es innerhalb eines Voxels, in dem sowohl Fett als auch Wasser vorliegen, zu einem reduzierten Empfangssignal kommen. Zu diesem Zeitpunkt, der in der Literatur als „*Out of Phase*“ beschrieben wird, kommt es zu einer Aufhebung der verschieden orientierten Signalvektoren. Es entsteht eine charakteristische dunkle Linie an Grenzflächen von Wasser - und Fettgewebe.

## 2 Literaturübersicht

Dieses Phänomen kann jedoch ebenfalls zu einer Differenzierung von fetthaltigen gegenüber nicht - fetthaltigen Bereichen genutzt werden (Bushberg et al. 2002, McRobbie et al. 2007, Mihaljevic et al. 2009, Weishaupt et al. 2009).

### **Trunktionsartefakt**

Trunktions - oder auch Gibbs - Artefakte haben ihren Ursprung in der Fourier - Transformation der Bildrekonstruktion. Ein Trunktionsartefakt entsteht durch die ungenügende Aufnahme von Daten bzw. den jeweiligen hohen Ortsfrequenzen. Sie zeigen sich als parallel verlaufende Linien an kontrastreichen Grenzflächen und können durch die Wahl einer höheren Bildmatrix in Phasenrichtung vermieden werden (McRobbie et al. 2007, Mihaljevic et al. 2009, Weishaupt et al. 2009, Westbrook et al. 2011).

### **Partialvolumenartefakte**

Partialvolumenartefakte treten bei einer limitierten Ortsauflösung auf. Die verschiedenen Signalintensitäten verschiedener Gewebe werden hierbei in einem Voxel gemittelt. Ein hypointenses Signal wird mit seinem benachbart liegenden hyperintensiven Signal vereint und es kommt zu einer Darstellung eines intermediären Signales. Das Artefakt kann durch die Erhöhung der Schichten in Z - Richtung vermindert werden (Weishaupt et al. 2009, Westbrook et al. 2011).

## **2.1.4 MRT - Kontrastmittel**

### **2.1.4.1 Klinischer Einsatz**

Kontrastmittel sind ein in der MRT - Untersuchung häufig eingesetztes Hilfsmittel zur verbesserten Darstellung von pathologisch verändertem Gewebe. Mittlerweile finden in 25 - 30 % der MRT-Untersuchungen intravenöse Kontrastmittel standardmäßig Anwendung (Edelman et al. 2006). Die Markerstoffe der Magnetresonanztomographie haben den Vorteil gegenüber radioaktiven und fluoreszierenden Markern weniger toxisch zu wirken. Je nach Geräteparametern und Effizienz der Markierungstechnik bieten MRT - Kontrastmittel die Möglichkeit, Bilder mit hoher anatomischer Auflösung und hohem Weichteilkontrast zu liefern (Reiser u. Semmler 2002).

In der MRT - Bildgebung entsteht der Bildkontrast durch die Differenz in der Signalintensität zweier Gewebe. Die Intensitätsdifferenz der Signale (SI - Differenz)

## 2 Literaturübersicht

wird einerseits durch die gerätespezifischen Parameter (extrinsischen Faktoren) wie verwendeter Feldstärke, der Gradienten und Sequenzen und zum anderen die gewebespezifischen Parameter (intrinsische Faktoren) wie der Spin – Gitter - Relaxationszeit T1, der Spin – Spin - Relaxationszeit T2 und der Protonendichte des Gewebes beeinflusst (Reiser u. Semmler 2002, Westbrook et al. 2011). In der MRT eingesetzte Kontrastmittel zählen zu den Pharmazeutika und verstärken hauptsächlich durch ihre Beeinflussung der Relaxationszeiten (Suszeptibilitätseffekt) den Kontrast zwischen markierten und unmarkierten Bereichen. Durch ihre positive Wirkung auf den Kontrast und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften sind sie in der Lage, Sensitivität und Spezifität der Untersuchung zu erhöhen und auch funktionelle Aussagen zu ermöglichen (Reiser u. Semmler 2002, Weishaupt et al. 2009).

### 2.1.4.2 Magnetische Suszeptibilität

Die Wirkungsweise von MRT - Kontrastmitteln basiert auf dem Prinzip der magnetischen Suszeptibilität. Sie ist der Wert für die Magnetisierbarkeit eines Stoffes innerhalb eines magnetischen Feldes. Qualitativ unterscheidet man zwischen diamagnetischen, paramagnetischen, superparamagnetischen und ferromagnetischen Substanzen. Entscheidend für die Suszeptibilität eines Elementes ist die Anzahl der unpaaren elektrisch geladenen Teilchen (Elektronen) (Gomori u. Grossman 1988). Sowohl Protonen als auch Elektronen induzieren durch ihre Bewegung im Raum ein magnetisches Feld. Besitzt ein Stoff eine gerade Anzahl von Elektronen mit vollständigen Elektronengruppen, heben sich die entgegengesetzten antiparallelen Spins der Elektronenpaare auf und die magnetische Suszeptibilität ist negativ. Die als diamagnetische Stoffe bezeichneten Materialien sind als Kontrastmittel in der MRT - Untersuchung somit ungeeignet (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006).

**Paramagnetische Substanzen** wie Gadoliniumverbindungen verfügen über mindestens ein unpaares Elektron und ihre Suszeptibilität erhöht sich mit der Anzahl der unpaaren Ladungen. Im Magnetfeld kommt es im unmittelbaren Umfeld des paramagnetischen Kontrastmittels zu einer fokalen Erhöhung der Feldstärke und somit zur Wechselwirkung zwischen Kontrastmittel und angeregten Protonen. T1 - und T2 - Relaxation werden verkürzt und die Signalintensität vor allem in T1 gewichteten Aufnahmen konzentrationsabhängig erhöht (Positiv - Kontrastmittel).

## 2 Literaturübersicht

Substanzen mit paramagnetischen Eigenschaften fallen nach Entfernung des äußeren Magnetfeldes in ihren ursprünglichen, unausgerichteten Zustand zurück und weisen keine Restmagnetisierung auf (Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002).

**Ferromagnetische Stoffe** sind stärker magnetisierbar als paramagnetische Stoffe und besitzen ebenfalls unpaare Elektronen. Jedoch behalten diese sogenannten Multidomänenpartikel, wobei eine Domäne eine Region der Substanz mit spontaner Magnetisierung bezeichnet, auch nach Entfernen des äußeren Magnetfeldes eine Restmagnetisierung bei. Somit sind ferromagnetische Materialien als medizinische Kontrastmittel nicht einsetzbar (Fahlvik et al. 1993, Bushberg et al. 2002, Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006).

**Superparamagnetische Stoffe** (z.B. Endorem<sup>®</sup>, Resovist<sup>®</sup>) entsprechen in ihrer magnetischen Eigenschaft den ferromagnetischen Kontrastmitteln, sind jedoch in ihrer Partikelgröße so stark reduziert, dass sie sogenannte Eindomänenpartikel darstellen (Reiser u. Semmler 2002). In diesem Fall ist der Einfluss der Brownschen Molekularbewegung so groß, dass auch nach Entfernung des umgebenden Magnetfeldes keine Ordnung zwischen den Domänen entstehen kann und es kommt nicht zu einer verbleibenden Restmagnetisierung (Fahlvik et al. 1993). Es ergeben sich somit für superparamagnetische Stoffe keine Risiken für den Einsatz als Kontrastmittel. Gelangen die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO *superparamagnetic iron oxid*) in ein umgebendes Magnetfeld, welches einen stärkeren Einfluss als die entgegenwirkende Brownsche Molekularbewegung aufweist, richten sich die Domänen entlang der Feldlinien geordnet aus (Fahlvik et al. 1993, Rummeny et al. 2006). Das durch das Kontrastmittel erzeugte Magnetfeld induziert Feldinhomogenitäten im umgebenden Magnetfeld und führt somit durch sein großes magnetisches Moment zu einer Phasenverschiebung der umliegenden Protonen und einer Verkürzung der T<sub>2</sub> - Relaxationszeit. In T<sub>2</sub> gewichteten Sequenzen kommt es in der Folge zu einem Signalabfall des entsprechenden Gewebes (Negativ - Kontrastmittel) (Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006). Durch die enthaltenen Eisenoxidpartikel werden zusätzlich auch die T<sub>1</sub> - Relaxationszeiten der markierten Gewebe verkürzt und es kommt zu einem, im Vergleich zum T<sub>2</sub> - Effekt wesentlich schwächer ausgeprägten Signalanstieg auf T<sub>1</sub> - gewichteten Bildern (Abbildung 15) (Chambon et al. 1993).

## 2 Literaturübersicht

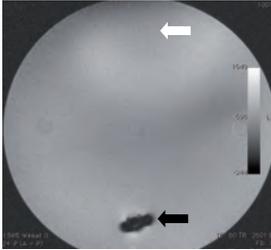


Abb. 15

Magnetresonanztomographische Darstellung eines Agargel - Phantoms (T2 - gewichtet): Eisenoxidhaltiges Kontrastmittel führt zu einer Beeinflussung des lokalen Magnetfeldes und damit zu einem hypointensen Signal (schwarzer Pfeil) während gadoliniumhaltiges Kontrastmittel (weißer Pfeil) zu keiner Beeinflussung des Magnetfeldes in der T2 - gewichteten Sequenz führt.

### 2.1.4.3 Einteilung der Kontrastmittel

Hinsichtlich des primären Effektes auf die Bildgebung unterscheidet man T1 - und T2- Kontrastmittel. Weiterhin lassen sich die Kontrastmittel in extrazelluläre und intrazelluläre (als makromolekulare Kontrastmittel bezeichnete), sowie unspezifische und spezifische Marker unterteilen (siehe Tabelle 1) (Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006, Weishaupt et al. 2009).

Die sogenannten T1 - Kontrastmittel, auch Positiv - Kontrastmittel genannt, verkürzen hauptsächlich die T1 - Relaxationszeit und führen somit zu einer Zunahme des T1 - Resonanzsignals. Klassische Vertreter sind gadoliniumhaltige Kontrastmittel. T2 - Kontrastmittel, sogenannte Negativ - Kontrastmittel, die die T2 - Relaxationszeiten verkürzen, führen hingegen primär zu einer Abnahme des erzeugten T2 - Signals. Das Eisenoxidpräparat Endorem<sup>®</sup> stellt hier einen der bekanntesten Vertreter dar. Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle Kontrastmittel sowohl einen T1 -, als auch einen T2 - Effekt aufweisen, jedoch meist der größere Signaleffekt im Fokus steht (Chambon et al. 1993, Edelman et al. 2006).

Extrazelluläre Kontrastmittel, wie beispielsweise Gd - DOTA und Gd - DTPA werden intravenös verabreicht und diffundieren in den extrazellulären Raum. Sie haben ein Molekulargewicht von < 1 Kilodalton (kDa), ihr Verteilungsvolumen entspricht annähernd dem Extrazellulärvolumen und sie werden durch ihre häufig sehr hohe glomeruläre Filtrationsrate zeitnah eliminiert (Reiser u. Semmler 2002, Edelman et al. 2006).

Das Molekulargewicht von makromolekularen Kontrastmitteln (*intrazelluläre Kontrastmittel*) wie zum Beispiel Albumin - Gd - DTPA liegt bei > 1 kDa und das Verteilungsvolumen entspricht annähernd dem Blutvolumen von Geweben. Auch die

## 2 Literaturübersicht

superparamagnetischen Eisenoxidkristallsuspensionen Ferumoxide oder Ferumoxtran besitzen die Eigenschaften von makromolekularen Kontrastmitteln. Die Größe der Dextranummantelten Eisenpartikel ist mit der von Plasmaproteinen vergleichbar (Rummeny et al. 2006).

Ferumoxide und Ferumoxtran zählen zudem zu den zellspezifischen MRT - Kontrastmitteln und können speziell zur Markierung von Organen wie Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark genutzt werden. Die Zellen des retikuloendothelialen Systems des intakten Gewebes phagozytieren den Markerstoff und führen somit zu einer Signalabschwächung in T2 - gewichteten Darstellungen (Josephson et al. 1988, Fahlvik et al. 1993, Hamm et al. 1994, Edelman et al. 2006). Gd - DTPA und Gd - DOTA hingegen gehören zu den niedermolekularen Kontrastmitteln und reichern sich unspezifisch in allen Organen an (Reiser u. Semmler 2002).

Tabelle 1 Übersichtstabelle Einteilung von häufig verwendeten MR Kontrastmitteln (Quellen: Josephson et al. 1988, Fahlvik et al. 1993, Hamm et al. 1994, Reiser und Semmler 2002, Edelman et al. 2006, Rummeny et al. 2006, Weishaupt et al. 2009, Westbrook et al. 2011)

Tabelle 1.1 T1 - und T2 - Kontrastmittel

Kontrastmittel	Handelsname	Anwendungsgebiet
<b>T1 - Kontrastmittel</b>		
Gd - DOTA	Dotarem®	Organ, Gefäß, ZNS
Gd - DTPA	Magnevist®	Organ, Gefäß, ZNS
<b>T2 - Kontrastmittel</b>		
Ferumoxide	Endorem® Resovist®	Leber, (Milz, Knochenmark)
Ferumoxtran	Sinerem®	Lymphknoten

Gd - DOTA = Gadotersäure; Gd - DTPA = Gadopentetat-Dimeglumin; T1 = T1 - Relaxationszeit; T2 = T2 - Relaxationszeit; ZNS = Zentrales Nervensystem

## 2 Literaturübersicht

Tabelle 1.2 Extrazelluläre und intrazelluläre Kontrastmittel

Kontrastmittel	Handelsname	Anwendungsgebiet
Extrazelluläre Kontrastmittel		
Gd - DOTA	Dotarem®	Organ, Gefäß, ZNS
Gd - DTPA	Magnevist®	Organ, Gefäß, ZNS
Makromolekulare / intrazelluläre Kontrastmittel		
Albumin – Gd - DTPA		MR - Angiographie, Perfusionsstudien

Gd - DOTA = Gadotersäure; Gd - DTPA = Gadopentetat - Dimeglumin; MR = Magnetresonanz; ZNS = Zentrales Nervensystem

Tabelle 1.3 Spezifische Kontrastmittel

Kontrastmittel	Handelsname	Anwendungsgebiet
Spezifische Kontrastmittel		
Hepatobiliär		
Gd – EOB - DTPA	Eovist®	Leber
Retikuloendotheliales System		
Ferumoxides	Endorem® Resovist®	Leber, (Milz, Knochenmark)
Ferumoxtran	Sinerem®	Lymphknoten

Gd – EOB – DTPA = Gadolenium-Ethoxybenzyl-Diethylentriamin-Pentaessigsäure

### 2.1.4.4 Ferumoxide: Endorem®

Das superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel (SPIO) Endorem® (*Guerbet GmbH, Sulzbach, Deutschland*) besteht aus einer Kristallsuspension von Eisenoxid ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Abbildung 16) mit einem Durchmesser von 3 bis 5 Nanometern. Das Produkt ist ebenfalls unter den Synonymen *advanced magnetic imaging* (AMI - 25®), welches während der Produktentwicklung Verwendung findet, und Ferridex®, dem Handelsnamen in den USA, bekannt. Endorem® ist mit erstmaliger Zulassung im Jahre 1996 das erste Beispiel für injizierbare Nanopartikel.

## 2 Literaturübersicht

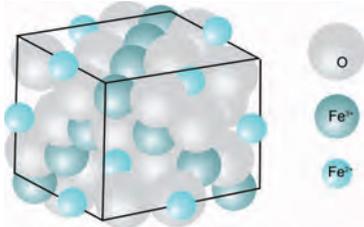


Abb. 16.  
Kristallgitterstruktur von Endorem®  
(modifiziert nach Fahlvik et al. 1993)  
Fe<sup>2+</sup> = zweiwertiges Eisen;  
Fe<sup>3+</sup> = dreiwertiges Eisen;  
O = Sauerstoff

Die Eisenoxidpartikel weisen einen Durchmesser von circa 150 Nanometern (120 - 180 nm) auf, gehören zu den SPIO und werden durch eine der Partikelaggregation entgegenwirkende Dextranhülle in einer wässrigen Lösung stabilisiert. Das Dextran besitzt ein niedriges Molekulargewicht (10.000 Dalton) und bestimmt durch seine angelagerte Menge auf der Oberfläche der Eisenoxidkristalle die Variation der Partikelgrößen. Durch den zusätzlichen Einsatz von Zitronensäure erreicht man eine negative Ladung der sonst neutral geladenen Partikelhülle. Die Osmolarität beträgt 340 mOsm / kg und der pH - Wert liegt bei 6,0 bis 8,0. Das Kontrastmittel ist biologisch abbaubar und wird in den normalen Eisenstoffwechsel aufgenommen. Endorem® wird als injizierbare Suspension von schwarzer bis braun - rötlicher Farbe in Form eines Infusionslösungskonzentrates vertrieben. 8 ml Lösung enthalten 89,6 mg Eisen, 60,8 mg Dextran, 2,7 mg Citrat, 490,4 mg Mannitol und 8 ml Wasser zu Injektionszwecken (Tabelle 2) (Wissenschaftliche Information Endorem®).

Endorem® wurde zur Identifizierung fokaler Leberläsionen entwickelt und steigert den Kontrast zwischen gesunden und tumorös veränderten Leberabschnitten. Das Wirkungsprinzip beruht auf der Aufnahme des superparamagnetischen Kontrastmittels durch die im normalen Lebergewebe vorkommenden retikuloendothelialen Zellen (Kupffer - Sternzellen) und der damit einhergehenden selektiven Beeinflussung der T2 - / T2\* - Relaxationszeit, die sich als Signalabschwächung zeigen (Edelman et al. 2006, Wissenschaftliche Information Endorem®).

Endorem® zählt somit zu den zellspezifischen Kontrastmitteln und wird nach intravenöser Injektion in absteigender Konzentration von den retikuloendothelialen Zellen der Leber (ca. 80 % Anreicherung), Milz (5 - 10 % Anreicherung), Lymphknoten und des Knochenmarkes angereichert (Hamm et al. 1994, Edelman et al. 2006).

## 2 Literaturübersicht

Tabelle 2 Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem®  
(Quelle: Wissenschaftliche Information Endorem®, Guerbet)

Wirkstoff	Formel	
	Spezifisch (pro 8 ml Ampulle)	Zentesimal (pro 100 ml)
Eisenoxid	q.s. 89,6 mg Eisen	q.s. 1,12 g Eisen
Andere Bestandteile		
Dextran	60,8 mg	0,76 g
Citrat	2,7 mg	0,034 g
Mannitol	490,4 mg	6,13 g
Wasser zu Injektionszwecken	q.s. 8 ml	q.s. 100 ml
Eigenschaften		
Osmolarität	340 mOsm / kg	
Viskosität	1,3 mPa s (20 °C)	
pH	6,0 – 8,0	

g = Gramm; mg = Milligramm; ml = Milliliter; mOsm = Milliosmol; mPa = Millipascal; pH = pH-Wert;

q.s. = quantum satis; s = Sekunde; C° = Grad Celsius

Weiterführend findet das Produkt Endorem® als eisenoxidhaltiges Kontrastmittel Einsatz in der Markierung verschiedener Zelllinien, darunter auch Stammzellen (Daldrup-Link et al. 2003, Edelman et al. 2006). Im Vergleich zu anderen molekularen Markierungsverfahren handelt es sich bei MRT - gestützten Untersuchungen um eine wenig sensitive Methode, die höhere Konzentrationen an Kontrastmittel benötigt. Auf Grund der außergewöhnlichen Möglichkeit, eine anatomische mit einer molekularen Darstellung in Einklang zu bringen, gibt es trotz der beschriebenen Nachteile ein großes Forschungsinteresse auf diesem Gebiet (Edelman et al. 2006).

Derzeit besteht für das Produkt Endorem® in Europa keine pharmazeutische Zulassung (direkte Information der Firma Guerbet). Somit findet das Präparat momentan keine Anwendung in der alltäglichen klinischen Bildgebung, steht jedoch für Studienzwecke zur Verfügung.

## 2.2 Stammzellen

### 2.2.1 Ursprung und Definition

Eine Stammzelle ist definiert als eine Zelle, die sich durch ihr Differenzierungspotenzial in diverse Zelltypen und ihre nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit auszeichnet. Eine Zelle dieser Art ist in der Lage, diesen Stammzellstatus dauerhaft beizubehalten, da bei einer Teilung mindestens eine Tochterzelle mit dem Entwicklungspotenzial der Mutterzelle entsteht. Stammzellen weisen somit die Fähigkeit zur Selbsterneuerung auf (Kühl u. Kühl 2012) (Abbildung 17).

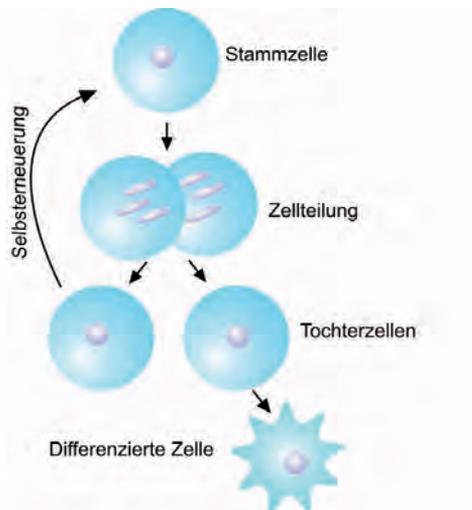


Abb. 17  
Schemadarstellung zur Selbsterneuerung von Stammzellen

Es werden embryonale (*engl. embryonic stem cells, ESCs*) und adulte Stammzellen (*engl. adult stem cells, ASCs*) unterschieden. Embryonale Stammzellen können 5 - 7 Tage nach der Befruchtung aus dem Inneren der Blastozyste gewonnen werden und besitzen die Fähigkeit, sich in jeden Zelltyp aller drei Keimblätter sowie extraembryonaler Gewebe differenzieren zu können (*totipotentes Differenzierungspotenzial*). Davon lassen sich die Epiblasten ähnlichen pluripotenten Zellen unterscheiden, die sich ebenfalls in Zellen aller 3 Keimblätter differenzieren können, jedoch nicht mehr in der Lage sind, sich in Trophoblastenzellen oder andres

## 2 Literaturübersicht

extraembryonales Gewebe umzuwandeln (Schnorr u. Kressin 2006, Kühl u. Kühl 2012).

Adulte Stammzellen können aus den späteren Embryonalstadien bis hin zum adulten Organismus entnommen werden und ihre Differenzierungsfähigkeit ist im Vergleich zu den davor genannten begrenzt. Sie dienen dem Körper zur Homöostase und Regeneration von Geweben und Organen. Man unterscheidet multipotente Stammzellen von oligopotenten Progenitor- (*engl. progenitor cell*) und unipotenten Vorläuferzellen (*engl. precursor cell*). Multipotente Zellen sind in ihrer Entwicklung so weit fortgeschritten, dass aus ihnen nur noch die Zellen eines bestimmten Keimblattes (mesenchymale, ektodermale oder endodermale Zellen) hervorgehen können (Caplan 1991, Young u. Black 2004, Kühl u. Kühl 2012). Progenitorzellen besitzen die Potenz, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, haben jedoch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung im Verlauf ihrer Entwicklung verloren. Als Beispiel seien hier neuronale Stammzellen genannt. Vorläuferzellen sind bereits hochentwickelt, so dass die weitere Differenzierung zu einer bestimmten Zellart determiniert ist. Dies gilt zum Beispiel bei Chondroblasten, Osteoblasten, Myoblasten und anderen (Kühl u. Kühl 2012).

## 2 Literaturübersicht

Tabelle 3 Übersichtstabelle, Differenzierungspotenzial von Stammzellen

(modifiziert nach Kühl u. Kühl 2012)

Begriff	Definition	Beispiel
totipotent	Stammzelle, die in der Lage ist, alle Zellen eines Organismus als auch der Keimzellen und Zellen extraembryonaler Gewebe zu bilden	– Zygote – Blastomere (frühe Furchung)
pluripotent	Stammzelle, die jegliche Zelle aller drei Keimblätter bilden kann	spätere embryonale Stammzelle aus Blastocyste
multipotent	Stammzellen, die nur noch Zellen eines bestimmten Keimblattes regenerieren können	– mesenchymale Stammzellen – hämatopoetische Stammzellen
oligopotent	Zellen, die nur noch wenige Zelltypen eines Gewebes bilden können	neurale Stammzellen
unipotent	Zelle, die sich nur noch in einen Zelltyp differenzieren kann	– Chondroblasten – Osteoblasten – Myoblasten u. weitere

### 2.2.2 Geschichtlicher Rückblick

Nach Entdeckung der pluripotenten embryonalen Karzinomazellen in Teratokarzinomen des Hodens in den 1950er Jahren erkannte man 1962 die embryonalen Keimzellen als gutartige Stammzelllinie des sich entwickelnden Embryos. Mesenchymale Stammzellen konnten bereits 1968 erstmals erfolgreich isoliert werden. 1981 gelang Martin Evans und Gail Martin die Isolierung und Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus. Achtzehn Jahre später setzte James Thomson 1998 durch die Isolierung humaner embryonaler Stammzellen einen Meilenstein in der Stammzellgeschichte (Kühl u. Kühl 2012).

### 2.2.3 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (*Mesenchymal stem cells, MSC*) sind unspezialisierte multipotente Zellen, die dem mesodermalen Keimblatt zuzuordnen sind (Caplan 1991, Zuk et al. 2001, Tapp et al. 2009). Sie wurden erstmals 1968 aus dem

## 2 Literaturübersicht

menschlichen Knochenmark isoliert und erfolgreich zu Osteoblasten / Osteozyten differenziert. Für diese Zellen wurde eine fibroblastenähnliche Morphologie und damit ein spindelförmiges Erscheinungsbild beschrieben. Die multipotenten Zellen dienen mit ihrem hohen Proliferations - und Differenzierungspotential dem Körper als Reservezellen und können aus einer Vielzahl mesenchymaler Gewebe entnommen werden (Caplan 1991, Sakaguchi et al. 2005, Tapp et al. 2009, Kühl u. Kühl 2012). Isolationsmöglichkeiten wurden bisher für das Knochenmark (Sakaguchi et al. 2005, Caplan 2007), das Blut, die Skelettmuskulatur (Bosch et al. 2000, Sakaguchi et al. 2005), das Fettgewebe (Zuk et al. 2001, Tapp et al. 2009, Vieira et al 2010), das Periost (Sakaguchi et al. 2005), die Synovialmembran und Synovialflüssigkeit (Sakaguchi et al. 2005, Koga et al. 2008), das Sehngewebe sowie die Nabelschnur beschrieben. Des Weiteren finden sich multipotente Zellen auch in Organen wie dem Gehirn, der Leber oder der Niere (Kühl u. Kühl 2012). Ihre finale Differenzierung wird stark durch die umgebenden Zellen und die Sekretion von Signalmolekülen, löslichen Faktoren und Präsentation von Oberflächenmolekülen bestimmt. Einen weiteren Faktor bei der Induktion und Hemmung von Umwandlungsprozessen bilden Sauerstoffmoleküle, Ionen oder reaktive Sauerstoffspezies. Rigidität und Elastizität des umliegenden Gewebes und der umgebenden extrazellulären Matrix weisen ebenfalls einen Effekt auf die Differenzierung auf (Kühl u. Kühl 2012). In vitro entwickeln sich die mesenchymalen Stammzellen je nach Zusammensetzung des Kulturmediums und Beschaffenheit des Untergrundes in Knochen -, Knorpel -, Sehnen -, Muskel -, Fett -, Nerven - und Bindegewebszellen (Caplan 1989, Tapp et al. 2009) (Abbildung 18).

Neben der Bereitstellung von Ersatzzellen besteht eine entscheidende Fähigkeit in der stammzelleigenen Sekretion löslicher Biofaktoren zur Hemmung von Narbenbildung und Apoptose sowie Förderung der Angiogenese und Mitose von Stamm - und Progenitorzellen (Caplan 2007). Durch die Hemmung von T - und B - Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen wirken die Faktoren zugleich immunmodulatorisch und entzündungshemmend (Tse et al. 2003, Corcione et al. 2006, Ramasamy et al. 2007, Tögel et al. 2007, Spaggiari et al. 2008).

In der Literatur finden sich verschiedene Synonyme: mesodermale Progenitorzellen (*mesodermal progenitor cells MPC*), multipotente Stromazellen, mesenchymale Stromazellen (Chen et al. 2008).

## 2 Literaturübersicht

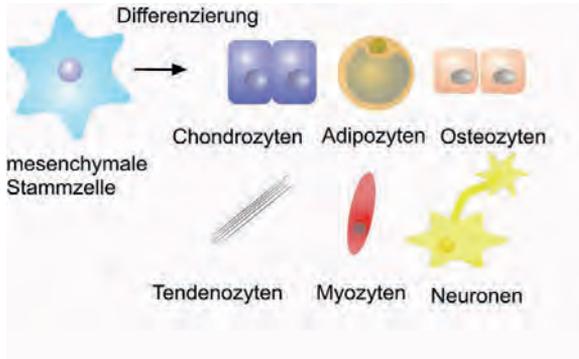


Abb. 18  
Übersicht Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen  
(modifiziert nach Kühl u. Kühl 2012)

Im Vergleich zur Humanmedizin ist die Charakterisierung anhand von zellulären Markern oder Oberflächenmolekülen der MSC beim Haustier bisher noch uneinheitlich. Humane Antikörper führen nicht immer zu Kreuzreaktionen mit dem tierischen Antigen und die kommerziellen Marker sind oftmals nicht für die verwendete Spezies erhältlich (Tapp et al. 2009). Die „International Society of Cellular Therapy“ legt für humane MSCs drei entscheidende in vitro Merkmale fest. Zum einen weisen die Zellen unter standardisierten Kulturbedingungen eine typische Plastikadhärenz auf. Des Weiteren sind sie in der Lage, sich in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen zu differenzieren und werden daher als tripotent differenzierbar bezeichnet. Als drittes Merkmal wird das Vorliegen oder Fehlen bestimmter Oberflächenmoleküle beschrieben (*cluster of differentiation CD*). So sind mindestens  $CD\ 105^+$ ,  $CD\ 90^+$ ,  $CD\ 73^+$  in 95 % der Zellen positiv oder  $CD\ 45^-$  (spezifisch für Leukozyten),  $CD\ 34^-$  (spezifisch für hämatopoetische Vorläuferzellen und Endothelzellen),  $CD\ 14^-$  (spezifisch für Makrophagen) oder  $CD\ 11b^-$  (spezifisch für Monozyten),  $CD\ 79^-$  (spezifisch für B - Zellen),  $CD\ 19^-$  (spezifisch für B - Zellen), und HLA - DR<sup>-</sup> (humanes Leukozyten Antigen) in weniger als 2 % vorhanden (Kühl u. Kühl 2012).

Vieira und Mitarbeiter (2010) beschreiben für die aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen des Hundes ähnliche Charakterisierungsmerkmale. Die Fibroblasten ähnlichen Zellen sind plastikadhärent, weisen eine Differenzierbarkeit in Fett -, Knorpel -, Knochen - und Muskelzellen auf und können anhand bestimmter vorkommender ( $CD\ 44^+$ ,  $CD\ 29^+$ ( $\beta$  integrin),  $CD\ 90^+$ ) und fehlender

Oberflächenmoleküle (CD 13<sup>+</sup>, CD 14<sup>+</sup>, CD 34<sup>+</sup>, CD 45<sup>+</sup>, CD 73<sup>+</sup>, CD 117<sup>+</sup>) identifiziert werden. Für CD 13, CD 71 und CD 105, die beim Menschen exprimiert werden, verwendeten Vieira und Mitarbeiter (2010) jedoch humane Antikörper, die nicht spezifisch für den Hund verfügbar waren.

### **2.2.4 Stammzelltherapie**

Adulte Stammzellen spielen eine große Rolle in der Erforschung regenerativer Therapien und wurden in den vergangenen Jahren in Tiermodellen, aber auch humanmedizinischen Studien am Menschen intensiv untersucht (Kühl u. Kühl 2012, Schwarz et al. 2012). Frühe embryonale Stammzellen weisen durch ihre Totipotenz zwar einen Vorteil durch ihr hohes Differenzierungspotenzial auf, ihre Isolation ist jedoch sehr schwierig und nur unter moralisch ethisch fragwürdigen Methoden möglich. Unter Zerstörung des Embryoentwicklungsstadiums werden embryonale Stammzellen nach der Befruchtung aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Speziell in der humanen Zellforschung besteht eine große ethische Kontroverse hierzu. Befürworter und Gegner diskutieren, ob der frühe Embryo als menschliches Wesen bereits unter den Würdeschutz des Grundgesetzes fällt (Kühl u. Kühl 2012). Nach einem Urteil des Europäischen Gerichtshofes aus dem Jahre 2011 dürfen menschliche embryonale Stammzellen, für deren Gewinnung Embryonen zerstört werden, nicht patentiert werden. Hier begründete man den Beschluss mit der Tatsache, dass es sich bei befruchteten Eizellen bereits um menschliches Leben handle (Gerichtshof der Europäischen Union, Pressemitteilung Nr. 112 / 11). In Deutschland ist es nach dem Embryonenschutzgesetz generell verboten, humane Embryonen für Forschungszwecke herzustellen, zu klonen oder zu zerstören. Eine Ausnahme bildet hingegen der im Stammzellgesetz verankerte stichtagbezogene Import bereits produzierten Zellen, dem jedoch enge Grenzen gesetzt sind. (Embryonenschutzgesetz EschG 2011, Stammzellgesetz StZG 2013). In anderen Ländern, zum Beispiel den USA, bestehen teilweise abweichende und weniger strikte Regelungen im Bezug auf die humane embryonale Stammzellforschung (Kühl u. Kühl 2012).

Multipotente Stammzellen hingegen sind technisch weniger aufwändig und ohne moralisch ethische Bedenken aus dem adulten Körper zu entnehmen. Sie stehen in fast unbegrenzter Anzahl für die autologe Therapie zur Verfügung. Man unterscheidet zwischen dem systemischen Einsatz durch Injektion in die Blutbahn

## 2 Literaturübersicht

und der lokalen Therapie. Bei der lokalen Anwendung werden die Zellen in Suspension oder in ein dreidimensionales biokompatibles Trägermaterial (*Scaffold*) eingebettet und direkt an den Defekt verbracht.

In den vergangenen Jahren konnte ein beachtlicher Fortschritt im Bereich der mesenchymalen Stammzelltherapie und ihrem Einsatz zur Rekonstruktion von Geweben beobachtet werden (Wayne et al. 2005, Zhou et al. 2006, Lopez-Laguna et al. 2011). Neuartige therapeutische Strategien werden zur Behandlung von verschiedensten Erkrankungen des Skelettsystems entwickelt und auf ihre klinische Einsetzbarkeit erprobt (Liu et al. 2002, Guo et al. 2004, Tobias et al. 2012).

Trotz zahlreicher existierender Studien sind jedoch wichtige Komponenten, wie Wirkmechanismen oder Langzeitverläufe in Bezug auf die Zelltherapie ungeklärt. So bestehen offene Fragen in Bezug auf die biologische Verteilung der Zellen nach Implantation in einen Gewebedefekt und somit zur Effektivität und Sicherheit dieser Methoden (Edelman et al. 2006, Min et al. 2007, Tobias et al. 2012, Kon et al. 2012). Studien gehen davon aus, dass ein großer Teil der positiven Effekte auf geschädigtes Gewebe nicht nur durch den Ersatz der Zellen sondern parakrine Mechanismen und immunmodulatorische Effekte zustande kommt (Tögel et al. 2007). Die Ortsgebundenheit bzw. das Verharren der eingebrachten Zellen an ihrem gewünschten Wirkungsort ist eine unabdingbare Voraussetzung für einen therapeutischen Effekt und bedarf weiterer Untersuchungen (Lopez-Laguna et al. 2011). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass auch die Konzentration der im Defekt eingebrachten Zellen einen wesentlichen Einfluss auf das Resultat der Therapie hat (Koga et al. 2008).

### 2.2.5 Zellmarkierung

Um eine Nachverfolgbarkeit der Zellen, sogenanntes „*Cell Tracking*“, zu realisieren, gibt es bereits Arbeiten zur Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, Radioisotopen oder der Verwendung von Spenderzellen des jeweilig anderen Geschlechtes, um das Y - Chromosom als einen natürlichen Marker zu verwenden (Frangioni et al. 2004, Edelman et al. 2006, Koga et al. 2008, Cheng et al. 2009). Ein genereller Nachteil dieser Methoden ist die Notwendigkeit der Biopsieentnahme und der damit einhergehenden *ex - vivo* Untersuchung im Verlauf der Detektion. Um eine Nachverfolgbarkeit ohne Biopsieentnahme *in - vivo* zu ermöglichen, sucht man nach alternativen Markerstoffen, die in der magnetresonanztomographischen

## 2 Literaturübersicht

Untersuchung zu Signalveränderungen führen. Eisenoxidpartikel, welche im Fokus der aktuellen Forschung stehen und auch in anderen Bereichen der MRT - Kontrast Untersuchung eingesetzt werden, eignen sich als intrazelluläre Markerstoffe in der *in - vivo* MRT (Daldrup-Link et al. 2003, Edelman et al. 2006, Lopez-Laguna et al. 2011).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Eisenoxidmarkierung von beispielsweise „*Adipose derived mesenchymal stem cells*“ (ADMSCs), Myofibroblasten oder auch mononukleären Knochenmarkzellen deren Lebensfähigkeit sowie die Differenzierbarkeit nicht beeinflusst (Sadek et al. 2008, Saldanha et al. 2008, Lopez-Laguna et al 2011).

In humanmedizinischen Studien und Tierversuchen an Hund, Maus, Ratte und Schwein werden Zellen bereits erfolgreich mit „*small particular iron oxids*“ (SPIOs) markiert und im „*Cell Tracking*“ der Neurochirurgie, Pankreas - Transplantation, Nephrologie, Herzchirurgie, Knochenchirurgie sowie dermalen Onkologie mit Hilfe einer magnetresonanztomographischen Untersuchung nachgewiesen (Bos et al. 2004, Sykova et al. 2006, Bulte et al. 2009, Feng et al. 2011, Lopez-Laguna et al. 2011)

### 2.3 Anatomische Grundlagen Kniegelenk Hund

#### 2.3.1 Einteilung

Das Kniegelenk wird den *Articulationes synoviales* zugeordnet und setzt sich aus folgenden Anteilen zusammen: den knöchernen Gelenkenden, die mit dem hyalinen Gelenkknorpel, *Cartilago articularis*, überzogen sind, der Gelenkhöhle, *Cavum articulare*, der umgebenden Gelenkkapsel, *Capsula articularis*, sowie den stabilisierenden Gelenkbändern, *Ligamenta articularia* (Nickel et al. 2003).

Nach der Anzahl der gelenkbildenden Knochen gilt das Kniegelenk als zusammengesetztes Gelenk, *Articulatio composita*. Es gliedert sich in das Kniekehlgelenk, *Articulatio femorotibialis*, und das Kniescheibengelenk, *Articulatio femoropatellaris*, und wird von 3 knöchernen Anteilen gebildet (Nickel et al. 2003, König u. Liebich 2011, Evans 2012).

#### 2.3.2 Kniekehlgelenk

##### 2.3.2.1 Aufbau und funktionelle Eigenschaften

Das Kniekehlgelenk setzt sich aus den zwei Kondylen des *Os femoris* und der *Facies articularis proximalis* der Tibia zusammen. Da die Kontur der Gelenkerhöhung bildenden Kondylen in der Seitenansicht dem Abschnitt einer Spiralwindung ähnelt, zählt man es zu den Spiralgelenken, *Articulatio spiralis* (Abbildung 19). Bei dieser Art von Gelenken liegen sowohl die Drehachse als auch der Seitenbandansatz exzentrisch, so dass sich vor allem in der Beugstellung und der damit einhergehenden Dehnung der Seitenbänder eine bremsende Wirkung ergibt (Nickel et al. 2003, Salomon et al. 2008).

Nach der Form der artikulierenden Gelenkflächen ordnet man das Kniekehlgelenk den inkongruenten Gelenken zu. Bei dieser Art von Gelenken wird die bestehende Inkongruenz im Kniekehlgelenk zwischen Femurkondylen und *Facies articularis proximalis* des Schienensbeins durch zwei puffernde Faserknorpelscheiben, *Meniscus medialis* und *Meniscus lateralis*, ausgeglichen. Die Menisken sind halbmondförmige Gebilde und besitzen einen scharfen, konkaven Innenrand und einen dickeren, konvexen Außenrand (König u. Liebich 2011, Tobias u. Johnston 2012). In der Bewegung kommt es somit zu einer, dem eigentlichen Wechselgelenk typischen Gleitbewegung der Tibia zusammen mit den durch Bänder verbundenen Menisken über die Femurkondylen. Zugleich besteht durch die Form der Gelenkenden und die

## 2 Literaturübersicht

Verschieblichkeit der Menisken die Möglichkeit leichter Drehbewegungen innerhalb des Gelenkes, so dass das Kniekehlgelenk auch als ein unvollkommenes Wechsellgelenk bezeichnet werden kann (König u. Liebich 2011).



Abb. 19  
Schematische Darstellung des Spiralgelenkes  
F = Femur; T = Tibia; a = Radius in Beugestellung; b = Radius in Mittelstellung  
(modifiziert nach Salomon et al. 2008)

### 2.3.2.2 Gelenkkapsel

Das Kniekehlgelenk verfügt im Vergleich zu anderen Gelenken über eine relativ weitläufige Gelenkkapsel, die mit ihrer *Membrana fibrosa* an den Gelenkrändern von Ober- und Unterschenkelknochen, sowie an den abaxialen Meniskenrändern fixiert ist. Beim Hund und anderen Fleischfressern besteht zwischen dem medialen und lateralen Gelenksack, der durch das innenliegende *Stratum synoviale* geformt wird, eine offene Verbindung. Desweiteren wird die Gelenkhöhle durch die Menisken in eine proximale und eine distale Partie gegliedert, die ebenfalls über den axialen Bereich der Faserknorpelscheiben kommunizieren. Medial kommt es zu einem Kontakt der dorsalen Gelenkaussackung des Kniekehlgelenkes mit dem Synovialraum des Kniescheibengelenkes (Nickel et al. 2003, Salomon et al. 2008, Tobias u. Johnston 2012). Lateral besitzt der Gelenksack des Kniekehlgelenkes zwei weitere Aussackungen. Zum einen besteht eine distale Fortsetzung in den *Sulcus extensorius* der Tibia, wodurch eine Umfassung des Ursprungs des *M. extensor digitorum longus* der *Recessus subextensorius* gebildet wird. Zum anderen bildet eine weitere laterale Ausbuchtung den *Recessus subpopliteus*, indem es die Ursprungsehne des *M. popliteus* umgibt (Tobias u. Johnston 2012). Bei den

## 2 Literaturübersicht

Fleischfressern umschließt die Gelenkkapsel des Kniekehlgelenkes ebenfalls die Vesalischen Sesambeine (*Ossa sesamoidea m. gastrocnemii*) und dessen Gelenke mit den Femurkondylen (Nickel et al. 2003, Salomon et al. 2008).

### 2.3.3 Kniescheibengelenk

#### 2.3.3.1 Aufbau und funktionelle Eigenschaften

Das Kniescheibengelenk, *Articulatio femoropatellaris*, setzt sich zusammen aus der *Trochlea ossis femoris* und der *Patella*, dem größten Sesambein des Körpers (Nickel et al. 2003, Evans 2012, Tobias u. Johnston 2012). Es wird nach der Form seiner Gelenkflächen und der daraus resultierenden Art seiner Bewegung als Schlittengelenk, *Art. delabens*, bezeichnet. Gleichzeitig zur Bewegung des Kniekehlgelenkes gleitet die *Facies articularis* der *Patella* auf der konvexen, von den zwei Rollkämmen flankierten *Trochlea* des Oberschenkelknochens (Nickel et al. 2003, Evans 2012).

#### 2.3.3.2 Gelenkkapsel

Die Gelenkkapsel des Kniescheibengelenkes ist ebenfalls sehr weitläufig. Sie bildet nach proximal eine Aussackung unter den *M. quadriceps femoris* und steht distal mit der Kniekehlgelenkshöhle in Verbindung (Salomon et al. 2008).

### 2.3.4 Bandverbindungen

Die Bänder des Kniegelenkes können in die Bänder des Kniekehlgelenkes, des Kniescheibengelenkes und der Menisken unterteilt werden (Salomon et al. 2008, Tobias u. Johnston 2012).

#### 2.3.4.1 Bänder des Kniekehlgelenkes

Das Kniekehlgelenk besitzt als Verbindung zwischen Femur und Unterschenkelknochen sowohl kräftige Seitenbänder, *Ligg. collateralia*, als auch die zwei innenliegenden Kreuzbänder, *Ligg. cruciata genus*.

#### Seitenbänder

Das *Lig. collaterale laterale* entspringt am *Epicondylus lateralis femoris* und zieht von dort unter Kreuzung der Ursprungsehne des *M. popliteus* zu seinem Ansatz am *Condylus lateralis tibiae* und *Caput fibulae*. Das *Lig. collaterale mediale* hat seinen

## 2 Literaturübersicht

Ursprung im Bereich des *Epicondylus medialis femoris* und zieht zum *Condylus medialis* der Tibia (Salomon et al. 2008, Tobias u. Johnston 2012).

### Kreuzbänder

Innenliegend im Gelenk, jedoch von den beiden Synovialhäuten umhüllt, finden sich die Kreuzbänder, *Ligg. cruciata genus*. Das *Lig. cruciatum craniale* entspringt im kaudalen Abschnitt der interkondylären Fläche des *Condylus lateralis femoris* und kreuzt beim Fleischfresser diagonal in der *Fossa intercondylaris* zu seinen Ansatz in der *Area intercondylaris cranialis tibiae*. Das längere *Lig. cruciatum caudale* verkehrt zwischen der kranialen interkondylären Fläche des *Condylus medialis femoris* und der *Area intercondylaris caudalis tibiae*, sowie der *Incisura poplitea* der Tibia (Salomon et al. 2008, Tobias u. Johnston 2012).

### 2.3.4.2 Bänder des Kniescheibengelenkes

Zu den Bändern des Kniescheibengelenkes zählen das *Lig. patellae* und die *Retinacula patellae*. Das *Lig. patellae* ist das sehnige Ende des *M. quadriceps femoris*. In diesem ist die Kniescheibe als Sesambein eingelagert und es reicht vom *Apex patellae* an die *Tuberositas tibiae*. Das Kniescheibenband und die Kniescheibengelenkkapsel grenzen an den extrasynovialen Kniefettkörper, *Corpus adiposum infrapatellare*. Des Weiteren findet sich proximal von der Ansatzstelle der Sehne die *Bursa infrapatellaris distalis* (Nickel et al. 2003, Salomon et al. 2008).

Die *Retinacula patellae*, oder auch die als Haltebänder der Kniescheibe bezeichneten Ligamenta, sind beiderseits der Kniescheibe bestehende Verstärkungen der Gelenkkapsel. Beim Hund kommen lediglich das *Lig. femoropatellare mediale* (Abbildung 20) und *laterale* als einzige Bestandteile des *Retinaculum patellae mediale* bzw. *laterale* vor. Die sehr schmalen Bänder entspringen medial und lateral am jeweiligen *Os sesamoideum musculi gastrocnemii* und inserieren an den Seitenflächen der *Patella* (Nickel et al. 2003, Salomon et al. 2008).

## 2 Literaturübersicht

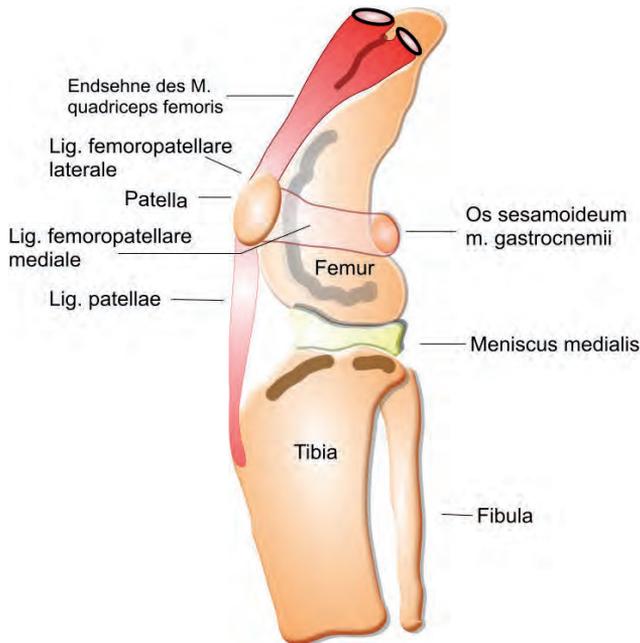


Abb. 20

Kranio-laterale Ansicht des Kniegelenkes mit Übersicht der Bänder des Kniegelenkes.

Das aus der Endsehne des M. quadriceps femoris hervorgehende Lig. patellae, das Lig. femoropatellare mediale, sowie das in der Abbildung verdeckt liegende Lig. femoropatellare laterale mit anliegenden anatomischen Strukturen.

(modifiziert nach König u. Liebich 2011)

### 2.3.4.3 Meniskenhaltebänder

Die Meniskenhaltebänder fixieren die zwei halbmondförmigen Faserknorpelscheiben an *Tibia* und *Femur*. Sowohl lateraler als auch medialer Meniskus besitzen je ein kraniales und ein kaudales Band, welches sie mit der *Tibia* verbindet. Zudem existiert ein fünftes Halteband, das *Lig. meniscofemorale*, welches vom kaudalen Rand des lateralen Meniskus als einzige Verbindung an den interkondylären Bereich des *Femur* zieht. Beim Hund sind zudem die kranialen Winkel der Menisken über das *Lig. transversum genus* verbunden (Salomon et al. 2008) (Abbildung 21).

## 2 Literaturübersicht

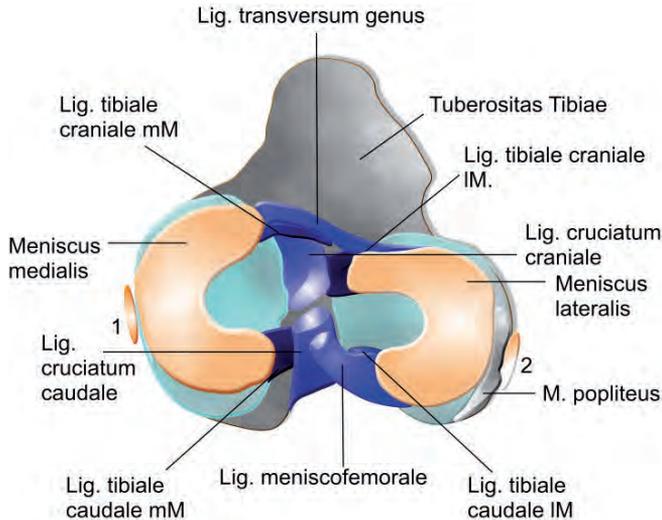


Abb. 21

Übersicht über die Mensikenhaltebänder

1 = Lig. collaterale mediale; 2 = Lig. collaterale laterale; mM = medialer Meniscus; IM = lateraler Meniscus  
(modifiziert nach Tobias u. Johnston 2012)

### 2.3.5 Synovia

Die Synovia oder Gelenkflüssigkeit ist eine klare, leicht gelbliche, hochvisköse Flüssigkeit, die von ihrer Zusammensetzung derer des Blutserums nahe kommt. Ihre Hauptbestandteile sind Hyaluronsäure, Proteine, Glukose, Wasser und abgeschilferte Zellen (Synovialozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten). Ihre Aufgaben bestehen in der Herabsetzung der Reibungskräfte zwischen den Gelenkflächen, der Stoßdämpfung und der Ernährung des Gelenkknorpels durch Diffusion und Konvektion. In tieferen Knorpelschichten ist der durch Diffusion verursachte Nährstoffaustausch nur noch eingeschränkt möglich, so dass erst durch größere Flüssigkeitsverschiebungen zwischen Gelenkhöhle und extrazellulärer Matrix eine adäquate Nährstoff - und Sauerstoffversorgung der Chondrozyten gegeben ist. Hierzu bedarf es einer wechselnden Be- und Entlastung des Gelenkknorpels, ohne die es zu einer Minderversorgung und in dessen Folge zu einem Untergang der Chondrozyten kommt (Welsch 2003, Liebich 2004, Salomon et al. 2008).

### 2.3.6 Gelenkknorpel

#### 2.3.6.1 Bestandteile und Eigenschaften

Der an den gelenkbildenden Knochenenden vorkommende hyaline Knorpel ist das im Körper am häufigsten vorkommende Knorpelgewebe. Er ist elastisch, verformbar und in einem hohen Maße stoßdämpfend (Salomon et al. 2008, Tobias u. Johnston 2012). Seine Hauptbestandteile sind Chondrozyten, Kollagenfasern und die Grundsubstanz. Er besitzt keine Nerven und Gefäße und seine Ernährung erfolgt fast ausschließlich über die Diffusion und Konvektion von Synovialflüssigkeit (Joest 1969, Welsch 2003). Der Knorpel weist eine glatte Oberfläche auf, ist bei Jungtieren von bläulich milchiger Farbe und stellt sich in dünnen Bereichen durchscheinend transparent dar. Mit steigendem Alter nimmt die Wasserbindungskapazität ab und er verfärbt sich gelblich. Zugleich verringern sich seine Verformbarkeit und Elastizität (Joest 1969, Welsch 2003, Liebich 2004). Seine Dicke variiert je nach Gelenk und steht immer im Bezug zu seiner Belastung. So zeigt sich an konvexen Gelenkflächen die Knorpeldicke zentral dicker als in der Peripherie. Bei konkaven Gelenkflächen findet sich peripher eine größere Knorpeldicke (Joest 1969, Salomon et al. 2008). Insgesamt zeigt sich jedoch eine sehr variable Knorpeldicke sowohl innerhalb eines Gelenkes als auch im Vergleich zwischen verschiedenen Gelenken (Simon 1970, Eckstein 1998). Jurvelin und Mitarbeiter (1989) können zeigen, dass die Knorpeldicke beim Hund mit steigender Belastung zu- und bei Ruhigstellung abnimmt. Ähnliche Studien existieren auch für die Humanmedizin (Müller-Gerbl et al. 1987, Li et al. 2005), wohingegen eine Arbeitsgruppe um King 2005 eine Abnahme der Knorpeldicke bei andauernder Belastung beschreibt.

In verschiedenen Studien an Beagle Hunden kann eine Knorpeldicke am medialen Femurkondylus von 0,5 - 1,06 Millimeter und am lateralen Kondylus von 0,46 bis hin zu 1,19 Millimetern gemessen werden (Kiviranta et al. 1987, Kiviranta et al. 1988, Kiviranta et al. 1994, Newton et al. 1997, Arokoski et al. 1999, Haapala et al. 2000). Daten bei Hunden über 20 Kilogramm Körpergewicht ergeben für den lateralen Kondylus einen Mittelwert von 0,61 Millimetern (0,53 - 0,68 mm) und für den medialen 0,79 Millimeter (0,69 - 0,89 mm) Knorpeldurchmesser (Böttcher et al. 2009).

#### Histologie

Auf zellulärer Ebene betrachtet entstehen die knorpelbildenden Chondroblasten wie Osteoblasten über perichondrale Fibroblasten aus der Differenzierung

## 2 Literaturübersicht

mesenchymaler Stammzellen. Aus dieser abgeplatteten Vorstufe entstehen anschließend die reifen, runden, großblasigen Chondrozyten. Sie zeichnen sich meist durch ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum und einen prominenten Golgi - Apparat aus. Dies sind Anzeichen der im Verlauf von Faser - und Glykosaminoglykanbildung gesteigerten Protein - und Kohlenhydratsynthese. Auf Grund ihrer hohen sekretorischen Aktivität finden sich zahlreiche Vesikel sowie für den anaeroben Stoffwechsel benötigte Glykogen und Lipidtropfen im Zytoplasma. Des Weiteren zeigt sich innerhalb der Zelle ein gut entwickeltes Zytoskelett bestehend aus dem Intermediär - Filament Vimentin (Welsch 2003).

Die Knorpelmatrix, die von den Chondrozyten gebildet wird, setzt sich zusammen aus geformten dünnen Fibrillen (15 - 45 nm Dicke) vom Kollagen Typ II, dem Fibrillen verbindenden Kollagen Typ IX und Kollagen Typ X, welches die hypertrophen Zellen umgibt und Kollagen XI, dessen Funktion noch unbekannt ist. Weitere ungeformte Bestandteile sind Hyaluronsäure und das Proteoglykan Aggrecan, welches die wasserbindenden und damit für die Elastizität des Knorpels verantwortlichen Keratan- und Chondrotinsulfatketten enthält (Welsch 2003). Die Zellen liegen typischerweise in isogenen Zellgruppen (2 - 6 Zellen) zusammen und bilden zusammen mit den umgebenden stark sulfatierten Glykosaminoglykanen (Knorpelhof) ein Chondron, auch Knorpelterritorium genannt. Der Bereich zwischen den Chondronen wird als Interterritorium bezeichnet und enthält keine Zellen (Welsch 2003, Liebich 2004). Knorpelwachstum ist sowohl interstitiell als auch appositionell möglich. Beim interstitiellen Wachstum kommt es zu einer erneuten Teilung von bereits differenzierten Chondrozyten und dem Abscheiden neuer Grundsubstanz. Appositionelles Wachstum hingegen zeichnet sich durch die Vermehrung und Differenzierung der perichondralen Chondroblasten am Knorpelrand aus (Welsch 2003, Liebich 2004).

### **2.3.6.2 Knorpelzonen**

Je nach Gestalt der Zellen, dem Verlauf der Fasern und der Zusammensetzung der Grundsubstanz unterscheidet man vier Knorpelzonen (Abbildung 22) (Liebich 2004, Salomon et al. 2008).

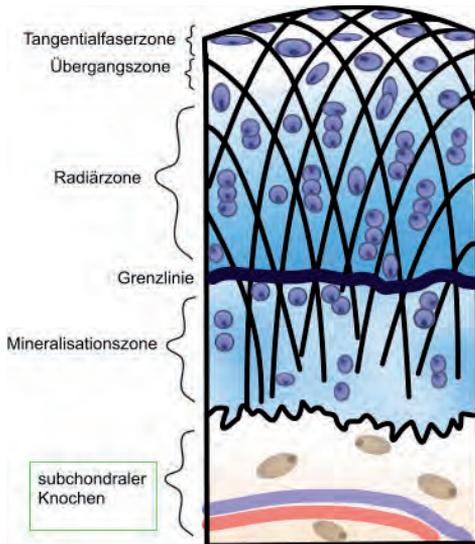


Abb. 22  
Schematische Darstellung der Knorpelzonen  
(modifiziert nach Salomon et al. 2008)

Die Tangentialfaserzone, *Zona superficialis*, enthält spindelförmige Chondrozyten, die sich im hyalinen Gelenkknorpel mit ihrer Längsachse parallel zur Knorpeloberfläche anordnen (Joest 1969, Salomon et al. 2008). Diese Schicht ist nur wenige 100  $\mu\text{m}$  breit (Poole 1997). Die im Lichtmikroskop nicht sichtbaren Kollagenfasern weisen in diesem Bereich ihre Scheitelpunkte auf, verlaufen somit tangential und ziehen von hier aus parabelförmig in die tieferen Knorpelschichten (Salomon et al. 2008). Der Verlauf der Spaltlinien gibt Auskunft über die bevorzugte Faserrichtung in dieser Schicht (Clarke 1971) und steht im direkten Zusammenhang mit der mechanischen Beanspruchung der Knorpelzone (Costa u. Madeira 1982). Elastizität, Zugfestigkeit und Rigidität haben ihre Maximalwerte bei zu den Spaltlinien paralleler Krafteinwirkung (Kempson et al. 1968, Roth et al. 1980, Mizraih et al. 1985). Im Bereich der Gelenkknorpelränder setzt sich die *Zona superficialis* in die *Membrana synovialis* der Gelenkkapsel fort (Salomon et al. 2008).

In der darunter liegenden *Übergangszone*, der *Transitionalzone* (Böttcher 2010), liegen die Chondrozyten einzeln oder in Paaren schräg angeordnet zwischen den bogenförmig verlaufenden, sich kreuzenden Kollagenfasern. Die darauf folgende *Radiärzone* zeichnet sich aus durch einen fast senkrecht zur Gelenkoberfläche, sich

## 2 Literaturübersicht

lediglich noch in spitzen Winkeln kreuzenden Verlauf der Kollagenfasern und eine säulenartige Anordnung der Chondrozyten (Welsch 2003, Salomon et al. 2008, Böttcher 2010). Sie macht zirka ein Drittel des Gelenkknorpels aus und ist somit die breiteste Schicht (Poole 1997). Die Zellen enthalten in diesem Bereich ein gehäuftes Maß an endoplasmatischem Retikulum und einen großen Golgi - Apparat, welches für eine gesteigerte Synthese der extrazellulären Substanz spricht (Welsch 2003, Salomon et al. 2008).

Zwischen der *Radiär* - und der darauf folgenden *Mineralisationszone* befindet sich eine nur Mikrometer dicke kalziumreiche Grenzlinie, deren Funktion bisher noch unbekannt ist. Einige Autoren bezeichnen diesen Bereich als *Grenzlinie* oder *Tidemark* (Poole 1997, Welsch 2003, Salomon et al. 2008). Die *Mineralisationszone* verbindet den Knorpel in zahlreichen verzahnende Fortsätzen mit dem darunter liegenden *subchondralen Knochen*. Es gibt in dieser Schicht nur wenige Chondrozyten und in der Grundsubstanz zeigt sich ein hoher Gehalt an Kalziumphosphatkristallen. Während der Wachstumsphase kommt es im Bereich der Mineralisationszone zur enchondralen Ossifikation. Speziell im Bereich dieser Zone besteht ein lebenslanges Potenzial zur Knochenumbildung und -neubildung (Welsch 2003, Salomon et al. 2008).

### 2.3.6.3 Chondrale Ossifikation

In der embryonalen Entwicklung bildet das fetale Knorpelgewebe das primäre Stützgerüst des späteren knöchernen Skelettsystems. Das bereits vorhandene Knorpelgewebe wird in einem komplizierten Prozess in Knochengewebe umgewandelt (Welsch 2003, Salomon et al. 2008). Die chondrale Ossifikation gliedert sich in die perichondrale und die enchondrale Ossifikation. Am langen Röhrenknochen bildet sich im Bereich der mittleren noch knorpeligen Diaphyse im Verlauf der perichondralen Ossifikation eine umgebende Knochenmanschette. Wie auch bei der desmalen Knochenbildung wandeln sich die Chondroblasten des Perichondriums unmittelbar in Osteoblasten um und produzieren osteogenes Gewebe (Salomon et al. 2008). Diese „Geflechtknochen - artige“ Manschette stützt den Knochen, während sich die Zellen im Zentrum der Diaphyse in den hypertrophen Blasenknorpel umwandeln. Es kommt zum Verkalken der umgebenden Matrix und die eingeschlossenen Zellen gehen zugrunde. Blutgefäße penetrieren den verkalkten Blasenknorpel und stellen den Beginn der enchondralen Ossifikation dar (Welsch 2003, Liebich 2004). Über die Blutgefäße wandern Chondroblasten in das verkalkte

## 2 Literaturübersicht

Gebiet (*Eröffnungszone*) ein und beginnen mit dem Abbau der Substanz. Die geschaffenen Hohlräume bieten Platz für weitere Blutkapillaren und Mesenchym, aus dem sich über Osteoprogenitorzellen die Osteoid produzierenden Osteoblasten entwickeln (Liebich 2004). Durch die Verkalkung des Osteoids und Differenzierung der Zellen zu Osteozyten breitet sich der entstandene Geflechtknochen von der mittleren Diaphyse in Richtung der vorerst knorpelig verbleibenden Epiphysen aus. Im Verlauf der Entwicklung wird der primär gebildete Geflechtknochen durch weitere Umbauprozesse zum endgültigen Lamellenknochen (Welsch 2003, Salomon et al. 2008). Die Markhöhle entsteht und das verbliebene Bindegewebe differenziert sich in hämoretikuläres Knochenmark (Liebich 2004). Bei der anschließenden Verknöcherung der Epiphysen entsteht ebenfalls primär ein gefäßdurchzogener Knochenkern, der sich in die Peripherie ausbreitet und einen schmalen Knorpelsaum im Bereich der Gelenkflächen belässt. Ist das Längenwachstum der Röhrenknochen abgeschlossen, verknöchert auch der Bereich der Metaphyse und die Epiphysenfugen schließen sich auf die bereits beschriebene Art der enchondralen Ossifikation (Welsch 2003, Liebich 2004).

### 2.3.6.4 Knorpeldefekte

#### Defektentwicklung

Durch die Anordnung der Kollagenfasern in der *Tangentialfaserzone* kommt es bei oberflächlichen Beschädigungen des Knorpels in diesem Bereich zu einer oberflächenparallelen Abschliffung. Geht der Schaden über diese Zone hinaus, entstehen auf Grund des Faserverlaufes vertikale Risse im Knorpel (Salomon et al. 2008). Speziell in der *Tangentialfaserzone* kommt es durch die im Alter rückläufige Synthese von Grundsubstanz zu einer verminderten Wasserbindungskapazität und in dessen Folge zu einer Demarkierung der Tangentialfasern, auch als Astbestfaserung bezeichnetes Phänomen. Es erfolgt eine Fibrillation der Knorpeloberfläche und es kommt zu degenerativen arthrotischen Veränderungen (Welsch 2003, Liebich et al. 2004, Salomon et al. 2008).

#### Osteochondrose

Die Osteochondrose ist definiert als das Resultat einer nicht infektiösen, generalisierten Störung der enchondralen Ossifikation der Epiphysen oder auch der Wachstumsfugen und tritt an Prädilektionsstellen in bestimmten Gelenken auf (Grondalen 1979, Boudrieau et al. 1983, Ekman et al. 1998, Trostel et al. 2002,

## 2 Literaturübersicht

Ytrehus et al. 2007, Tobias et al. 2012). Sie ist gekennzeichnet durch das fokale Auftreten von Degenerationsprozessen im Bereich des Knorpels und des darunter liegenden subchondralen Knochenbettes (Grondalen 1979). Die Erkrankung wird sowohl in der Human -, als auch in der Tiermedizin bei verschiedenen Spezies, wie Hund, Pferd, Schwein, Rind sowie Geflügel beschrieben und ist unter Synonymen wie Osteochondrosis (dissecans) (OCD), Osteochondritis (dissecans) und Dyschondroplasie bekannt (Olsson 1993, Wiesner et al. 2000).

Die Zusatzbezeichnung „dissecans“ beschreibt das Vorliegen einer frei beweglichen abgelösten Knorpelschuppe im Gelenk (Wiesner et al. 2000).

Bei der Osteochondrose handelt es sich wahrscheinlich um ein multifaktorielles Geschehen, das durch Vererbung, schnelles Knochenwachstum, Ernährung, Belastung, Trauma sowie Ischämie zum Zeitpunkt der enchondralen Ossifikation beeinflusst wird. Durch fehlende Verknöcherung kommt es zu einem persistierenden Knorpelzapfen, der sich in der fortschreitenden Ossifikation zu einem osteochondrotischen Defekt entwickelt (Tobias et al. 2012). Das Krankheitsbild der OCD besteht gehäuft bei großwüchsigen, schnellwachsenden Hunderassen. Zu den prädisponierten Rassen gehören beispielsweise Deutsche Dogge, Rottweiler, Deutscher Schäferhund, Golden Retriever, Berner Sennenhund, Irischer Wolfshund, Labrador Retriever, Boxer und weitere (Grondalen 1979, Ubbink et al. 1992, Necas et al. 1999, LaFond et al. 2002, Ytrehus et al. 2007, Hecht 2010, Tobias et al. 2012).

Die Angaben zur Inzidenz der Osteochondrose des Hundes schwanken in der Literatur zwischen 0,3 % der insgesamt vorgestellten Patienten (Necas et al. 1999) und 3,7 % der auf Grund eines orthopädischen Problems vorgestellten Hunde (Johnson et al. 1994). Osteochondrotische Defekte treten beim Hund nach Necas et al. (1999) mit 75,9 % am häufigsten am Schultergelenk, meist im Bereich des kaudalen Caput humeri, auf. Das Kniegelenk - meist im Bereich des medialen Anteils des lateralen Femurkondylus - ist mit 16,1 % am zweithäufigsten betroffen, gefolgt vom Tarsalgelenk an der Trochlea tali medialis, seltener auch lateral mit 4,4 % und dem Ellenbogengelenk, Trochlea humeri, mit 3,6 %. In einer Studie von Harari (1998) wird die Inzidenz der Osteochondrose des Kniegelenkes mit 8% als weitaus weniger häufig beschrieben. Als Grund für diese abweichende Beobachtung wird die Prädisposition der verschiedenen vorgestellten Rassen genannt. Bei der Osteochondrose handelt es sich oftmals um eine häufig bilateral symmetrisch auftretende Erkrankung (Variationen zwischen 20 - 80 %), wobei männliche Tiere

## 2 Literaturübersicht

dreimal häufiger betroffen sind als weibliche Tiere (Olsson 1993, Necas et al. 1999, Fossum 2007, Tobias et al. 2012).

Im Bereich des Kniegelenkes befindet sich der Knorpeldefekt meist im Bereich der medialen Belastungszone des lateralen Femurkondylus oder in seltenen Fällen des medialen Kondylus. Klinische Symptome zeigen sich vermehrt zwischen dem 5. und 7. Lebensmonat (Arbesser 1974, Denny u. Gibbs 1980, Harai 1998, Scott 1999, Fossum 2007, Tobias et al. 2012). Übliche klinische Anzeichen sind verschiedene Grade einer Hinterhandlahmheit nach Belastung, Steifigkeit nach Ruhephasen, Gelenkschmerzen, Gelenkfüllung, Streck- und Beugehemmung, Muskelatrophie, Pseudokrepitation und eine abnormale Stellung der Gliedmaßen im Sitzen (Scott 1999, Fossum 2007).

### **Diagnostik**

In der röntgenologischen Untersuchung ist die Abflachung oder konkave Auswölbung des subchondralen Knochens und eine damit einhergehende Sklerose im betroffenen Bereich des Kondylus auf mediolateralen sowie kraniokaudalen Röntgenaufnahmen das typische Bild einer ausgeprägten Erkrankung (Abbildung 23 und 24). Die sichtbaren Veränderungen können jedoch von kleinen subchondralen Aufhellungen bis hin zu großen Defekten im gewichttragenden Gelenkbereich reichen. Beschrieben wird ein transluzentes Areal mit oder ohne sklerotischen Randsaum. In einer Studie von Morgan und Mitarbeitern (2000) wird die kaudokraniale Aufnahme gegenüber der kraniokaudalen als vorteilhaft beschrieben. Durch den minimalen Abstand der Kondylen zur Röntgenplatte und den senkrecht zum Gelenkspalt auftreffenden Röntgenstrahl ist eine besonders gute Beurteilung der distalen Kontur der Femurkondylen möglich (Morgan et al. 2000). Die Arbeitsgruppen um Arbesser (1974) und Clayton-Jones (1980) beschreiben eine leicht rotierte mediolaterale Projektion als optimale Aufnahme, um beide Kondylen auseinanderprojiziert zu beurteilen.

In manchen Fällen kann die abgelöste Knorpelschuppe mit Hilfe der Röntgenuntersuchung in situ oder als frei bewegliches Dissekat, *Corpus liberum*, im Gelenkspalt dargestellt werden. Dies setzt jedoch eine zumindest teilweise bestehende Kalzifizierung des Dissekates voraus (Denny u. Gibbs 1980, Montgomery et al. 1989, Scott 1999, Fossum 2007, Hecht 2010, Tobias et al. 2012). Häufig verbergen sich jedoch die mineralisierten Dissekate in den weitreichenden

## 2 Literaturübersicht

*Recessus* des Kniegelenkes und können vom Untersucher nicht eindeutig identifiziert werden (Arbesser 1974).

Fehlinterpretationen der Aufnahme können durch Verwechslung des Sesambeines des *Musculus popliteus*, der *Fossa extensoria* am lateralen Kondylus und auch eine Überlagerung der *Eminentia intercondylaris* der Tibia mit den Femurkondylen entstehen (Arbesser 1974).



Abb. 23  
Mediolaterale Röntgenaufnahme des rechten Kniegelenkes bei einem 8 Monate alten Berner Sennenhund: Der Pfeil markiert die Abflachung des Femurkondylus im Sinne eines osteochondrotischen Defektes.



Abb. 24  
Kraniokaudale Röntgenaufnahme des rechten Kniegelenkes eines 8 Monate alten Berner Sennenhundes: Der Pfeil markiert den halbmondförmigen Defekt im lateralen Femurkondylus mit umgebender Sklerosierung im Sinne eines osteochondrotischen Defektes.

### Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie wird in der Humanmedizin als Goldstandard bei Gelenkerkrankungen eingesetzt und findet Verwendung zur Evaluation von Ausprägung und Therapieerfolg (Reiser und Semmler 2002, Edelman et al. 2006, Rummeny et al. 2006). In der Tiermedizin ist der Einsatz in Bezug auf die OCD lediglich zur Diagnosefindung im Frühstadium der Erkrankung oder in unklaren Fällen beschrieben (Tratting et al. 2000, Tobias et al. 2012). Van Bree et al. (1993) zeigen, dass bereits mit Hilfe eines 0,5 Tesla Magnetresonanztomographen osteochondrotische Defekte in der Schulter des Hundes sicher diagnostiziert werden können und die erhobenen Befunde mit Methoden wie Arthrographie, Arthroskopie und histologischer Untersuchung korrelieren.

### **Defektheilung**

Hyaliner Knorpel besitzt auf Grund fehlender Vaskularisierung keinerlei Eigenschaften zur Selbstregeneration, so dass die Versorgung traumatischer oder degenerativer Defekte innerhalb des Gelenkes bisher ein therapeutisches Problem darstellt (Olsson 1993, Jackson et al. 2001, Litzke et al. 2004, Thiede et al. 2012).

Speziell das Nichtvorhandensein der sensiblen Innervation im Bereich des Gelenkknorpels führt häufig zu einer verspäteten Wahrnehmung des Knorpelschadens (Welsch 2003, Salomon et al. 2008). Im Weiteren entstehen Spätfolgen durch Schonung und Immobilisation des Gelenkes. Es kommt zu einem Abbau des noch bestehenden Knorpels und einer in Richtung des Gelenkspaltes fortschreitenden enchondralen Ossifikation. Die Folge ist eine Versteifung des betroffenen Gelenkes (Salomon et al. 2008).

Die Prognose der OCD wird abhängig von der Defektgröße, der Tiefe des Defektes, seiner Lage innerhalb des Gelenkes und bereits vorhandenen degenerativen Gelenkveränderungen beschrieben (Jackson et al. 2001, Steinhagen et al. 2001, Salomon et al. 2008, Van Buul et al. 2011). Gou und Mitarbeiter verweisen (2004) beispielsweise darauf, dass unbehandelte Defekte im Tiermodell Schaf mit einem Durchmesser größer als 3 Millimeter immer in einer unebenen Knorpeloberfläche mit daraus hervorgehendem Gelenkschmerz und Dysfunktion resultieren. Wohingegen Defekte mit einem Durchmesser von kleiner als 3 Millimeter eine Selbstheilung aufweisen können. Man geht davon aus, dass eine konservative Therapie mittels Ruhigstellung, Gewichtsreduktion und professioneller Physiotherapie in den meisten Fällen zu intermittierender Lahmheit und progressiver Arthrose führt (Olsson 1976, Fayolle et al. 1987, Hazewinkel et al. 2000, Butterworth u. Cook 2006). Eine konventionelle chirurgische Versorgung resultiert in der Regel in einer verbesserten Gliedmaßenfunktion mit lediglich spontan auftretender Lahmheit nach Belastung (Olsson 1976, Johnson u. Pettit 1980, Horst et al. 2000).

In der Veterinärmedizin gilt eine arthrotomische oder arthroskopische Entfernung der Knorpelschuppe als standardisiertes Verfahren für die Behandlung osteochondrotischer Defekte. Es erfolgt eine Kürettage der avitalen Defektränder mit anschließender Mikrofrakturierung oder Bohrung in das subchondrale Gewebe. Durch diese chirurgische Maßnahme soll eine Einblutung aus dem subchondralen Gewebe in den Defekt angestrebt werden. Aus dem sich im Defektbereich bildenden Koagel entsteht ein Ersatzgewebe aus Faserknorpel (Welsch 2003, Liebich 2004, Fossum 2007). Die Defektheilung durch Faserknorpel ist dem hyalinen

## 2 Literaturübersicht

Gelenkknorpel jedoch biomechanisch und funktionell unterlegen (Welsch 2003, Liebich 2004). Beschrieben ist auch nach einer operativen Versorgung die Ausbildung von Osteoarthrosen, so dass eine weiterführende medikamentöse Therapie oftmals erforderlich ist (Breur et al. 1989, Johnston 1998, Fossum 2007, Tobias et al. 2012).

Derzeitige Standardverfahren bringen nur in ausgewählten Bereichen gute Therapieerfolge (Horst 2000) und eignen sich vor allem für den Einsatz in frühen Stadien, zur Defektbehandlung von kleinen Defekten in Belastungszonen (z.B.: lateraler Condylus des Femur im Kniegelenk) oder zur Behandlung von größeren Defekten jedoch in belastungsarmen Zonen (z.B.: kaudaler Anteil des Caput humeri der Schulter) (Thiede et al. 2012).

Neuartige Methoden wie Mosaikplastik oder Allografttransplantation könnten den zuvor genannten Therapien überlegen sein, da es nicht zur Bildung eines fibrösen Ersatzgewebes kommt, sondern ein Implantat aus subchondralem Knochen mit hyalinem Knorpelgewebe eingebracht wird (Böttcher et al. 2007, Fitzpatrick et al. 2012). Tiermedizinische Langzeitstudien, die das „Implantatverhalten“ auf längere Sicht beurteilen, eine optimale Spenderstelle in Bezug auf Knorpeldicke und Spaltlinienverlauf beschreiben und klinisch relevante Schädigungen an der Entnahmelokalisation ausschließen, liegen derzeit noch nicht vor (Thiede et al. 2012).

### **Zelltherapie**

Die Integration von Zellen in synthetische Materialien oder sogenannten „*Scaffolds*“ zeigt sich derzeit als vielversprechend. Zahlreiche Studien beschreiben eine Defektheilung durch Hyalin ähnlichen Knorpel mit hohem Anteil an Kollagen Typ II und Proteoglycanen (Jackson et al. 2001, Liu et al. 2002, Litzke et al. 2004, Guo et al. 2004, Trzeciak et al. 2006, Thiede et al. 2012,).

Grundsätzlich unterscheidet man die Implantation von bereits differenzierten Chondrozyten von der Implantation von noch undifferenzierten Stammzellen.

Dabei gilt als eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Geweberekonstruktion bei beiden Methoden eine ausreichend hohe Zellzahl, der mögliche Zugang zu Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren sowie eine geeignete Matrix (Gao et al. 2007).

Die alleinige Implantation von autologen Chondrozyten erweist sich bisher sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin als äußerst vielversprechend. Vielfach ist

## 2 Literaturübersicht

eine zufriedenstellende Regeneration von hyalinem Knorpel beschrieben (Litzke et al. 2004, Trzeciak et al. 2006, Min et al. 2007, Dhollander et al. 2012). Speziell in Kombination mit kollagenen Membranen erweisen sich autologe Chondrozyten als eine Möglichkeit der Defektbehandlung (Zheng et al. 2007). Vorteil dieser Methode ist, dass die Zellen bereits bei Implantation den Zellen des Zielgewebes entsprechen und keine weitere Differenzierung stattfinden muss (Thiede et al. 2012, Tobias et al. 2012). Die Gewinnung und Anzucht von ausdifferenzierten Knorpelzellen ist im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen mit zahlreichen Komplikationen behaftet. Beschrieben wird eine „Dedifferenzierung“ der Zellen während der Vermehrung in der Zellkultur, eine begrenzte Anzahl an zur Verfügung stehenden Spenderstellen und spätere Komplikationen an den Entnahmestellen (Gao et al. 2007, Thiede et al. 2012).

Mesenchymale Stammzellen hingegen besitzen als undifferenzierte Zellen eine unbegrenzte Teilbarkeit (Selbsterneuerung) und sind in der Lage, sich unter dem Einfluss von verschiedenen Faktoren in diverse Zelllinien zu differenzieren (siehe oben) (Gao et al. 2007, Vieira et al. 2010). Versuche mit *Adipose - derived mesenchymal stem cells* (ADMSCs) integriert in ein Pellet oder eine entsprechende Matrix zeigen sowohl *in - vivo* als auch *in - vitro* eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung mit gutem klinischen Erfolg nach Implantation in einen Knorpeldefekt (Wakitani et al. 1994, Zuk et al. 2001, Hunziker 2002, Guo et al. 2004, Wayne et al. 2005, Zhou et al. 2006).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Probengewinnung Fettgewebe

Das benötigte Fettgewebe für die Stammzellisolation stammt aus überschüssigem Bauchfettgewebe, welches routinemäßig im Verlauf von Bauchhöhlenoperationen fünf junger Hunde reseziert wird. Da sich dieses Gewebe im Sicht- und Arbeitsfeld des Operateurs befindet und einen weiteren Zugang zur Bauchhöhle behindert, ist die Entnahme dieses Fettgewebes ein Standardprozess am Beginn jeder Bauchhöhlenoperation. Die Tiere sind jünger als zwei Jahre, verschiedener Rasse, unterschiedlichen Gewichtes und Geschlechtes, und werden auf Grund von nicht orthopädischen Gründen (1 x inguinale Hernie, 1 x Lebershunt, 2 x Kastrationen, 1 x abdominaler Hoden) in der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt.

Während der Narkose unter Sevofluran (Braun) wird die Bauchhöhle steril eröffnet und das direkt unter der kranialen *Linea alba* befindliche Fettgewebe steril entnommen.

Das Fettgewebe wird direkt nach der Entnahme in ein 50 ml Falconröhrchen (Sarstedt) mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS Pufferlösung) (Gibco life technologies) verbracht und bei 6 °C bis zur Aufbereitung gelagert.

#### 3.1.2 Matrix

Für die Implantation der Stammzellen in das Kniegelenk wird das biokompatible ChondroFiller liquid<sup>®</sup> (Amedrix) als Kollagenmatrix verwendet (Abbildung 25). Hierbei handelt es sich um ein resorbierbares Implantat, das aus Kollagen Typ I, Kollagen-NF<sup>®</sup> (Amedrix) und einer unter standardisierten und kontrollierten Prozessen hergestellten Neutralisationslösung, 20GNL<sup>®</sup> (Amedrix) besteht. Die flüssigen Komponenten werden in zwei sterile, über einen Adapter gekoppelte, 1 ml BD-Spritzen (Amedrix) verbracht und mit diesen in den Knorpeldefekt injiziert. Sobald es bei Austritt aus der Spitze zum Vermischen der Komponenten kommt, beginnt die Gelierung und es entsteht innerhalb von wenigen Minuten ein stabiles, passgenaues Implantat (Gebrauchsanweisung, ChondroFiller liquid 2011).

## 3 Material und Methoden



Abb. 25

Zwei Komponenten des ChondroFiller liquid® links: Neutralisationslösung 20GNL® (*Amedrix*) rechts: Kollagenlösung Kollagen-NF® (*Amedrix*)

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe II.

Alle Laborschritte erfolgen, solange nicht explizit auf eine Abweichung hingewiesen wird, bei einer Raumtemperatur (RT) von ca. 20 °C.

##### 3.2.1.1 Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen (ADMSCs) aus dem Fettgewebe

Das aus der Bauchhöhle entnommene circa kastaniengroße Fettgewebe wird unter der Sterilbank (*Thermo Fischer Scientific*) des Zellkulturlabors, Institut für Veterinär – Anatomie, - Histologie und Embryologie Gießen, innerhalb von 24 h nach der Entnahme aus dem Falconröhrchen in eine Glaspetrischale (*Carl Roth*) gegeben. Die Fettmasse (Probengröße variiert zwischen 20 - 30 g) wird mit Hilfe einer sterilen Skalpellklinge (*Braun*) in 0,5 cm große Stücke zerschnitten. Diese werden nun in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt und in 20 ml PBS Pufferlösung bei 260 g. über 5 min in einer Zentrifuge (*Thermo Fischer Scientific*) gewaschen. Der Vorgang des Waschens wird je nach Kontamination (z.B. Vorhandensein von Blutbestandteilen) 1 - 3 mal wiederholt.

Zur Herstellung der Verdauungslösung werden pro ml Fettgewebe 1 mg Collagenase I (*Biochrom AG*) und 10 mg Bovines Serum Albumin (BSA) (*Sigma-Aldrich*) in 1 ml PBS Pufferlösung gelöst. Ist das Fettpellet frei von Blutbestandteilen, wird der verbliebene PBS Puffer abgesaugt und die entsprechende Menge Verdauungslösung

### 3 Material und Methoden

auf die Fettprobe gegeben. Das Falconröhrchen wird nun für 10 min in ein Wasserbad (*Gesellschaft für Labortechnik*) mit 37 °C verbracht und anschließend auf einem Rüttler (*Janke & Kunkel*) im Brutschrank (CO<sub>2</sub> Inkubator) (*Sanyo*) bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Nach 30 min wird die Konsistenz des Fettes überprüft. Hat es eine zähe homogene Konsistenz erreicht, ist der Verdauungsvorgang beendet und das Fett kann aus dem Brutschrank entfernt werden. Ist dieser Zustand noch nicht erreicht, wird die Probe noch weitere 5 - 10 min auf dem Rüttler belassen. Das verdaute Fett wird in der Zentrifuge bei 260 g. über 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet wird mit einer Plastikpipette (*Greiner bio-one*) abgesaugt und durch einen 70 µm Filter (*BD Falcon*) in ein neues 50 ml Falconröhrchen pipettiert. Reste im Filter werden mit PBS Pufferlösung ausgewaschen. Die gefilterte Probe wird anschließend mit 20 ml PBS einmalig bei 260 g. in der Zentrifuge über 5 min gewaschen. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (*Gibco life technologies*) mit 10 % Fetalem Bovinem Serum (FBS) (*PAA*) sowie 1 % Penicillin / Streptomycin (P/S) (*AppliChem*) (in der Folge als Standard - Zellkulturmedium beschrieben) resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (*Marienfeld*) wird die Zellzahl pro ml bestimmt. Eine Ausplattierung in kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) (*Greiner bio-one*) erfolgt dann mit 250 x 10<sup>3</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> (P0, Passage 0).

#### 3.2.1.2 Kultivierung der ADMSCs

Die Zellkulturflaschen werden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in einem Brutschrank (*Thermo Fischer Scientific*) inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgt zwei Mal wöchentlich. Hierfür wird ebenfalls das Standard - Zellkulturmedium bestehend aus DMEM mit 10 % FBS und 1 % P/S verwendet. Das gebrauchte Medium wird aus den Flaschen abpipettiert und die Zellen einmalig mit PBS Pufferlösung gewaschen (kleine Flaschen mit 2 ml, große Flaschen mit 5 ml Puffer). Anschließend werden die kleinen Flaschen mit 5 – 7 ml und die großen mit 10 - 15 ml frischem Standard - Zellkulturmedium befüllt und zurück in den Brutschrank verbracht. Im Zuge des Mediumwechsels erfolgt standardmäßig eine lichtmikroskopische Kontrolle (*Leica Microsystems*) der angewachsenen Zellen. Liegen die Zellen aneinander gereiht und besteht eine Konfluenz von über 80 % in der Zellkulturflasche, werden die Zellen passagiert.

### 3.2.1.3 Passage der kultivierten ADMSCs

Das vorhandene Zellkulturmedium wird verworfen und die Zellen mit PBS Pufferlösung gewaschen (kleine Flasche mit 2 ml, große Flasche mit 5 ml). Nach Absaugen der Pufferlösung wird Accutase (PAA) in die Kulturflaschen pipettiert (3 ml in eine kleine Flasche, 7 ml in eine große Zellkulturflasche). Die Zellen werden über weitere 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert und anschließend mikroskopisch auf das vollständige Ablösen der Zellen kontrolliert. Haben sich die Zellen noch nicht vollständig vom Kulturflaschenboden abgelöst, werden sie für weitere 3 min inkubiert. Sind alle Zellen gelöst, wird die Reaktion durch die gleiche bis doppelte Menge an Standard - Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wird nun aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml Falconröhrchen verbracht und bei 260 g. über 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet in Standard - Zellkulturmedium resuspendiert. Mittels einer Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl pro ml bestimmt und die Zellen erneut in einer Konzentration von ca. 250 x 10<sup>3</sup> Zellen pro Zellkulturflaschen ausplattiert.

### 3.2.1.4 Kryokonservierung der ADMSCs

Die Kryokonservierung dient der längerfristigen Lagerung der ADMSCs. Mit ihr ist es möglich, die Versuche in einheitlichen Zellpassagen und somit direkt vergleichbar durchzuführen. Im vorliegenden Versuch werden alle Zellen in der P1 (erste Passage) kryokonserviert.

Die Zellen werden ab einer Zelldichte von 80 % passagiert. Das Zellkulturmedium wird abgesaugt und die Zellen mit Accutase (Vorgang oben beschrieben) abgelöst. Anschließend wird das Zellpellet in 1 ml Standard - Zellkulturmedium resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer der Zellgehalt pro ml bestimmt. Das 50 ml Falconröhrchen wird unter Zugabe von weiteren 5 ml Standard - Zellkulturmedium erneut über 5 min bei 260 g. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Freezingmedium resuspendiert (0,5 ml pro 2 x 10<sup>6</sup> Zellen).

Die Zellen werden nun mit dem Freezingmedium in die Kryoröhrchen (*Carl Roth*) überführt und anschließend im Freezing Container Mr. Frosty (*Nalgene*) über 24 h bei - 80 °C gefroren. Der Container ermöglicht eine konstante Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C / min. Nach 24 h erfolgt die Umsetzung der Kryoröhrchen in den - 196 °C Stickstoffbehälter (*Thermo Fischer Scientific*).

## 3 Material und Methoden

### Freezingmedium

Für 100 ml Freezingmedium werden 65 ml DMEM, 30 ml fetales bovines Serum (FBS) und 5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) (*AppliChem*) vermischt und anschließend in 10 ml Falconröhrchen aliquotiert. DMSO verhindert als Gefrierschutzmittel die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses. Intrazelluläre Kristalle können die Zellorganellen beschädigen und in Folge dessen zum Absterben der Zellen führen. Das Freezingmedium wird bei - 20 °C gelagert und für das Einfrieren der Zellen frisch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

### 3.2.1.5 Auftauen der ADMSCs

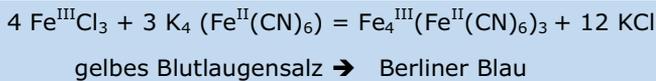
Die Kryoröhrchen werden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und unter der Sterilbank bei Raumtemperatur direkt nach der Entnahme kurz angedreht, um die Entstehung eines Überdruckes im Inneren zu verhindern. Im Folgenden tauen die Röhrchen erst bei 37 °C im Wasserbad über 30 sec und anschließend bei Raumtemperatur auf. Zusammen mit 5 ml Standard - Zellkulturmedium werden die aufgetauten Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 260 g. über 5 min zentrifugiert. Der Überstand des Falconröhrchens wird verworfen und die Zellen in 1 ml Standard - Zellkulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer erfolgt die Auszählung der Zellen und eine Ausplattierung in große Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) (in einer Dichte von 750 x 10<sup>3</sup> Zellen pro Flasche). Anschließend werden die ADMSCs bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.1.6 Endorem<sup>®</sup> Zellmarkierung

Nachdem die Zellen aufgetaut, ausplattiert und über 5 Tage inkubiert waren, werden die Hälfte der Zellen an Tag 6 des Versuches mit dem Eisenoxidpräparat Endorem<sup>®</sup> (*Guerbet*) markiert. Während 2 Zellkulturflaschen nach einer Waschung mit PBS Pufferlösung erneut mit Standard - Zellkulturmedium (als - E bezeichnet) bestückt werden, erhalten die 2 weiteren Flaschen zusätzlich zu 10 ml Standard - Zellkulturmedium weitere 283 µl Endorem<sup>®</sup> (als + E bezeichnet). Alle Flaschen werden über 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. An Tag 7 wird das Medium aller Proben verworfen, die Flaschen mit PBS Puffer gewaschen und die Zellen anschließend für den weiteren Versuch abgelöst und ausgezählt.

### 3.2.1.7 Eisennachweis: Berliner Blau Färbung

Die aus gleichen Teilen Kaliumhexacyanoferrat II (gelbem Blutlaugensalz) (*Merck*) und 1 %iger HCl Lösung (Salzsäure) (*Merck*) bestehende Färbelösung (im Folgenden Berliner Blau Lösung genannt) wurde bereits 1867 von Perls zum histochemischen Nachweis für dreiwertiges Eisen beschrieben. Das in den Zellen enthaltene Eisen wird durch die Salzsäure ionisiert. Das ionisierte Eisen hat nun eine hohe Affinität zum Ferrocyanid und verdrängt das Kalium. Es bildet sich das blaue Ferri – fero - cyanid (Berliner Blau), ein Salz, das schwer löslich ist (Welsch 2003, Mulisch et al. 2010).



Im zweiten Schritt wird mit Kernechtrot (*Merck*), das als Beize Aluminiumsulfat hat, gegengefärbt. Im Präparat stellen sich nun die Kerne rot, die dreiwertigen Eisenablagerungen blau dar (Welsch 2003, Mulisch et al. 2010).

Für die Berliner Blau Färbung werden die Zellen in einer Konzentration von  $47,5 \times 10^3$  und  $65,5 \times 10^3$  Zellen pro Well P3 (Passage 3) (entspricht  $25 \times 10^3 / 30 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung einer 24 Well Platte (*Greiner bio-one*) mit  $1,9 \text{ cm}^2$  Wells) auf Glasplättchen (Deckgläsern) (*Menzel GmbH*) ausplattiert. Der Ansatz erfolgt mit je 2 Wells mit (+ E) und ohne (- E) Endorem® - Markierung pro Konzentration. Die Zellen werden mit  $500 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium über 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert (Abbildung 26).

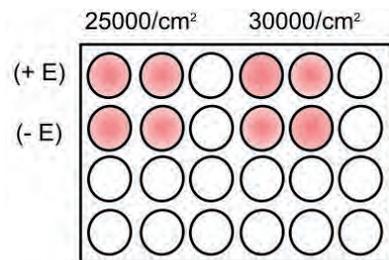


Abb. 26  
Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Berliner Blau Färbung, jedes Well enthält:  
links:  $25 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ; rechts:  $30 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ,  
+ E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen

### 3 Material und Methoden

Das Medium wird verworfen und die Zellen zweimalig mit 500  $\mu$ l PBS Pufferlösung über 3 min auf dem Rüttler gewaschen. Im Anschluss daran erfolgt eine Fixierung mit 200  $\mu$ l 4 %igem PFA (Paraformaldehyd) (*Merck*) über eine Dauer von 10 min auf dem Rüttler. Das PFA wird verworfen und die Wells werden erneut mit 500  $\mu$ l PBS Pufferlösung über je 3 min gewaschen. Die Berliner Blau Lösung wird frisch angesetzt. Es werden jeweils 200  $\mu$ l der Berliner Blau Lösung auf die Zellen gegeben und die Well Platte über 15 - 30 min auf dem Rüttler platziert. Anschließend erfolgt eine dreimalige Waschung mit PBS Pufferlösung über je 3 min und die Gegenfärbung der Kerne mit jeweils 200  $\mu$ l Kernechtrotlösung über 7 min. Kernechtrotlösung besteht aus 50 g Aluminiumsulfat – 18 - Hydrat (*Merck*) und 1 g Kernechtrot (*Merck*) in 1 l Aqua bidest gelöst. Schließlich erfolgt nochmals eine 3 minütige 3 fache Waschung mit jeweils 500  $\mu$ l PBS Pufferlösung. Die Glasplättchen werden aus den Wells entfernt und mit der, auf 60 °C erwärmten Kaisersgelatine (*Merck*) auf einem Objektträger (*Carl Roth*) fixiert.

#### 3.2.1.8 Vitalitätstests

##### 3.2.1.8.1 Die Phalloidin Fluoreszenzfärbung

Das Toxin Phalloidin ist ein Hauptvertreter der Phallotoxine und wurde erstmals von Theodor Wieland beschrieben. Es besitzt eine besondere Affinität zu F - Actin, einem entscheidenden Bestandteil des Zytosklettes, die man sich bei der Phalloidin Fluoreszenzfärbung zu Nutze macht. Phalloidin bindet zusammen mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff an die entsprechenden Teile des Zytosklettes und macht diese somit in der Fluoreszenzmikroskopie für den Betrachter sichtbar. Der Fluoreszenz - Farbstoff *Hoechst 33342*<sup>®</sup> wird in der Fluoreszenzmikroskopie zur Färbung von DNA genutzt und bewirkt eine Blaufärbung der Zellkerne. Eine anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung gibt somit Aufschluss über die Intaktheit der Zellstruktur sowie Vitalität der kultivierten Zellen (Hüffner u. Lindner 2001, Mulisch et al. 2010).

Die Phalloidin Färbung wird in einer Konzentration von  $47,5 \times 10^3$  und  $65,5 \times 10^3$  Zellen P3 pro Well (entspricht  $25 \times 10^3 / 30 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung einer 24 Well Platte mit  $1,9 \text{ cm}^2$  Wells) angefertigt. Pro Zellzahl werden je zwei Wells mit (+ E) und ohne (- E) Endorem<sup>®</sup> auf Glasplättchen angesetzt (Abbildung 27). Die

### 3 Material und Methoden

ausplattierten Zellen werden unter Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium über 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

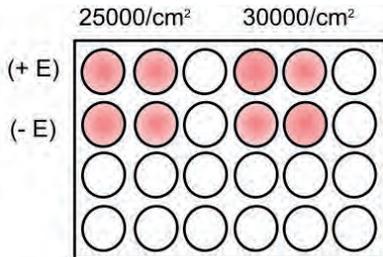


Abb. 27

Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für die Phalloidin Färbung, jedes Well enthält:

links:  $25 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ; rechts:  $30 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$

+ E = Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen; - E = nicht Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen

Das Zellkulturmedium wird verworfen und die Wells werden zweimalig mit 500  $\mu\text{l}$  PBS Pufferlösung über 3 min auf dem Rüttler gewaschen. Anschließend werden sie mit 200  $\mu\text{l}$  4 %igem Paraformaldehyd (PFA) über 10 min auf dem Rüttler fixiert. Das PFA wird abpipettiert und die Zellen wiederholt über 3 min mit 500  $\mu\text{l}$  PBS Pufferlösung gewaschen (2 x). Nach Verwerfen des Waschpuffers erfolgt die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Phalloidin Farbstoffgemisch. Der lichtempfindliche Farbstoff wird in einem lichtundurchlässigen Tube vorgemischt aus 5  $\mu\text{l}$  reinem Phalloidin (*Sigma-Aldrich*) und 195  $\mu\text{l}$  PBS. Die 24 Well Platte wird nun unter Lichtschutz über 30 min auf dem Rüttler platziert und anschließend 3 malig über jeweils 3 min mit 500  $\mu\text{l}$  PBS Waschpuffer behandelt. Es erfolgt eine ebenfalls lichtgeschützte 5 minütige Färbung mit 200  $\mu\text{l}$  Hoechst Farbstoffmischung. Die Hoechst Farbstoffmischung setzt sich aus 1  $\mu\text{l}$  Hoechst (*Invitrogen*) und 2000  $\mu\text{l}$  TBS Pufferlösung zusammen und wird ebenfalls in einem lichtgeschützten Tube vorgemischt. Anschließend wird der Farbstoff verworfen und die Wells zwei weitere Male mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und die Glasplättchen aus den Wells mittels Pro Long Gold<sup>®</sup> (Eindeckmittel) (*Invitrogen*) auf einem Objektträger fixiert.

Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop (*Carl Zeiss*) mit der Axiovision image analysis Software (*Carl Zeiss*).

### 3.2.1.8.2 MTT Test

#### **(3 - (4,5 – Dimethylthiazol – 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazoliumbromid Test)**

Der MTT Test zählt wie auch die Phalloidininfärbung zu den Zellvitalitätstests.

Bei dem MTT Test handelt es sich um einen sogenannten Zytotoxizitätstest, bei dem die lebenden Zellen das zugesetzte gelbe Tetrazoliumsalz (3 - (4,5 - Dimethylthiazol-2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazoliumbromid) (*Sigma-Aldrich*) in ein blau - violettes Formazan reduzieren (Langdorn 2004, Mulisch et al. 2010). Hierbei wird der Farbstoff sowohl durch pyridinhaltige Reduktionsäquivalente der endoplasmatisch-retikulären Enzyme (NADH und NADPH), als auch teilweise durch die mitochondriale Succinat - Dehydrogenasen reduziert. Somit stellt das entstandene Produkt ein Zusammenspiel aus Zellatmung und vor allem Glykolyserate (ER) der Zellen dar. Eine Messung des Farbumschlages gibt somit Aufschluss über die Lebensfähigkeit beziehungsweise die Anzahl lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe. Eine verminderte Kapazität zur Reduktion von MTT im Vergleich zur Kontrolle kann daher auf eine zellschädigende Wirkung von zugesetzten Stoffen hinweisen. Ob Apoptose, Nekrose, Hemmung von Enzymen oder Wachstumshemmung die Ursache sind, kann mit dem MTT Test jedoch nicht unterschieden werden. Da die Menge an umgesetztem Farbstoff zur Anzahl der Zellen proportional ist, wird der Test ebenfalls als Proliferationstest verwendet (Freudenberg et al. 2002, Mulisch et al. 2010).

Der MTT Test erfolgt an Tag 0, 1, 2, 3 des Hauptversuches jeweils in einer dreifach Bestimmung mit (+ E) und ohne (- E) Endorem<sup>®</sup> - Markierung. Die Zellen werden an Tag 0 in einer Konzentration von  $9,5 \times 10^3$  Zellen P3 pro Well (entspricht  $5 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung einer 24 Well Platte mit  $1,9 \text{ cm}^2$  Wells) und  $500 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium ausplattiert (Abbildung 28). Die Zellen werden nun bis zum vorgesehenen Testtag über 24 h, 48 h oder 72 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \%$   $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert.

### 3 Material und Methoden

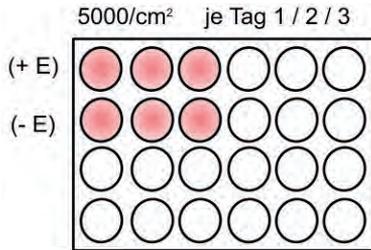


Abb. 28

Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für den MTT Test, pro Tag wurde eine Platte angesetzt, jedes Well enthält  $5 \times 10^3$  Zellen pro cm<sup>2</sup>

+ E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen

Eine Ausnahme hierbei bildet der Test von Tag 0, bei dem die  $9,5 \times 10^3$  Zellen jeweils in ein Eppendorfröhrchen (*Carl Roth*) pipettiert werden und direkt im Anschluss mit MTT Stammlösung und Standard - Zellkulturmedium inkubiert werden. Am jeweiligen Testtag wird das Standard - Zellkulturmedium verworfen und 300  $\mu$ l frisches Standard - Zellkulturmedium sowie 30  $\mu$ l MTT Stammlösung auf die Zellen gegeben. Die MTT Stammlösung wird für jeden Versuchsdurchlauf frisch angesetzt und besteht aus 5 mg MTT Pulver (*Sigma-Aldrich*) pro ml PBS Pufferlösung. Die Inkubation der Zellen erfolgt nun über weitere 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Das MTT Medium wird abgesaugt und verworfen. 200  $\mu$ l DMSO (Dimethylsulfoxid), ein organische Lösungsmittel, wird hinzugegeben. Um ein vollständiges Lösen der Kristalle aus den Zellen zu ermöglichen, wird die Wellplatte über 10 min auf dem Rüttler platziert. Die Lösungen werden in eine 96 Well Platte (*Greiner bio-one*) pipettiert und die Absorption bei 570 nm am Mikroplatten reader, Tecan Sunrise (*Tecan Group Ltd.*) gemessen.

#### 3.2.1.8.3 Life Cell Imaging

Mit dem Verfahren des Life Cell Imaging, oder Lebendzellmikroskopie, ist man in der Lage Zellmigration, -proliferation, aber auch Apoptose mit Hilfe von mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen zu dokumentieren. Im Gegensatz zu den statischen Momentaufnahmen, die mit fixierten und somit toten Zellen angefertigt werden, erlaubt es diese Methode, dynamische Vorgänge unter realen Bedingungen zeitabhängig zu betrachten. Zellkulturen werden über Stunden bis Tage unter Kulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in festgesetzten Intervallen digital aufgenommen. Die Abfolge der entstandenen Bilder zeigt sich bewegende und sich

### 3 Material und Methoden

teilende Zellen im Zeitraffer und bringt somit Informationen über die dynamischen Ereignisse in Ausschnitten von Zellnetzwerken. Spezielle Mikroskope ermöglichen mit Kontrastverfahren wie z.B. Phasenkontrast oder Differential Interference Contrast diese morphologischen Veränderungen der einzelnen Zelle oder auch des Zellverbandes zu visualisieren (Goldman et al. 2005, Veitinger u. Jiang 2012).

Das Culture - Insert System (*Ibidi*) stellt eine adhäsive, biokompatible Silikonform dar, in der Zellen auf einer definierten Fläche kultiviert werden. Die Form hat ein Außenmaß von 8,4 x 8,4 x 5 mm und besitzt zwei identische, strikt voneinander getrennte, 0,22 cm<sup>2</sup> große Kulturbereiche mit einem Füllungsvolumen von 70 µl (Abbildung 29).

Sie simuliert als eine neuartige Art des Scratch - Assay eine Form des Wundheilungsprozesses. Migration und Proliferation können nach Entfernung des Silikoninletts auf einem definierten zellfreien Areal von 500 µm zwischen den Zellverbänden mikroskopisch beobachtet werden. Es kommt zum Auswachsen der Zellen und Konfluieren der zwei Zellpopulationen im bisher zellfreien Zwischenraum. Anhand der gemessenen Zelldichte in diesem Bereich über die Zeit, kann auf das Wachstumsverhalten der Zellpopulation geschlossen werden (*Ibidi* Firmeninformation).

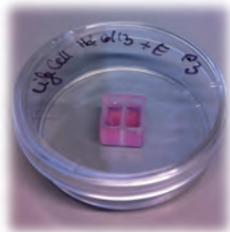


Abb. 29  
Versuchsansatz für das Life Cell Imaging  
Die Zellen befinden sich im Culture - Insert System (*Ibidi*), welches nach 24 h entfernt wird.

Der Life Cell Versuch im Culture - Insert wird mit  $35 \times 10^3$  Zellen P3 (Passage 3) und 70 µl Standard - Zellkulturmedium pro Kavität durchgeführt. Die mit Endorem<sup>®</sup> (+ E) markierten Zellen werden am 7. Versuchstag in das Culture - Insert eingesetzt und über 24 h mit diesem kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 24 h (Tag 8) wird mittels einer Pinzette das Silikoninlett entfernt und die kunststoff Kulturschale (*Sarstedt*) mit Standard - Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Kulturschale wird im Inkubationsraum des Life Cell Mikroskops (*Carl Zeiss*) positioniert und über 24 h mit jeweils 1 Bild pro

### 3 Material und Methoden

10 min gestartet. Am selben Tag wird ein Culture - Insert mit  $35 \times 10^3$  nicht markierter Zellen (P4) angesetzt und inkubiert. Am Tag 9 wird das Life Cell der Endorem<sup>®</sup> markierten Zellen beendet und gegen die nicht markierten Zellen ausgetauscht. Auch von diesen werden alle 10 min über 24 h digitale Standbilder angefertigt. Die Bilder werden mit Hilfe der ImageJ Software (*National Institutes of Health, USA*) ausgewertet. Aus den vorliegenden Daten werden getrennt pro Probe und getrennt nach Endorem<sup>®</sup> markierten (+ E) und nicht markierten (- E) Zellen jeweils zu jedem Zeitpunkt dreifach die nicht besiedelte freie Flächen über einen Zeitraum von 24 h ausgemessen (0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 15 h, 18 h, 21 h, 24 h) (Abbildung 30).

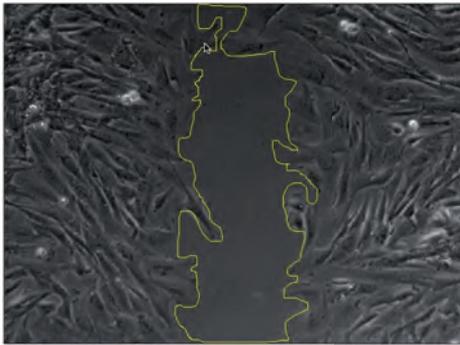


Abb. 30  
Life Cell Imaging. Ausmessung der noch nicht von Zellen besiedelten Fläche mit Hilfe des Programmes ImageJ (*National Institutes of Health, USA*). Der gelb umrahmte Bereich stellt die zu diesem Messzeitpunkt noch freie Fläche dar.

#### 3.2.1.9 Elektronenmikroskopie

Zur genaueren Begutachtung der Zellstruktur, Zellorganellen und des aufgenommenen Endorems<sup>®</sup> in der Zelle werden sowohl die markierten, als auch die unmarkierten Zellen einer Untersuchung unter dem Elektronenmikroskop (*Carl Zeiss*) unterzogen. Für die Elektronenmikroskopie werden die Zellen in einer Konzentration von  $100 \times 10^3$  Zellen pro Well (entspricht ca.  $55,56 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung eines *4 Well Lab-Tek Chamber Slide System (Thermo Fischer)* mit  $1,8 \text{ cm}^2$  Wellgröße) angefertigt. Es werden je zwei Wells mit und ohne Endorem<sup>®</sup> auf dem Slide angesetzt (Abbildung 31). Die ausplattierten Zellen werden unter Zugabe von  $1000 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium über 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \text{ \% CO}_2$  inkubiert.

### 3 Material und Methoden

Ansatz Yellow Fix (für 100 ml): 2 g Paraformaldehydpulver (*Merck*) in 50 ml kochendes Bidest einrühren. Anschließend klären durch tropfenweise Zugabe von 1 m. Natriumhydroxid NaOH (*Merck*). Nach dem Abkühlen werden je 25 ml 0,2 m. Caco - Dylat Puffer (*Merck Schuhardt*) / 0,2 m PBS Puffer zugegeben. Im Folgenden werden 0,02 % Pikrinsäure (*Fluka Analytical*) und 2 % Glutaraldehydlösung (*Agar Scientific*) hinzugefügt.

Das Zellkulturmedium wird verworfen und die Wells werden 2 malig mit  $1 \times 10^3 \mu\text{l}$  PBS Pufferlösung über je 3 min auf dem Rüttler gewaschen. Anschließend werden sie über 1 h mit je 1 ml Yellow Fix auf dem Rüttler fixiert und anschließend 6 fach über je 10 min mit 0,1 m. Coco - Dylat Puffer gewaschen.



Abb. 31

Versuchsansatz für das Elektronenmikroskop. Die Zellen befinden sich auf einem 4 Well Chamberslide System (*Thermo Fischer*). Jeweils 2 Wells enthalten Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen (+ E), 2 Wells enthalten unmarkierte Zellen (- E)

Im Anschluss erfolgt eine 30 min Nachfixierung mit 1 % Osmium tetroxide OsO<sub>4</sub> (*Plano*). Die Proben werden 3 fach mit 0,1 m. Caco - Dylat Puffer gespült und über je 10 min in 50 %, 70 %, 80 % und 96 % Ethanol (*Merck*) entwässert. Nach einer 3 maligen 10 min Behandlung mit 100 % Ethanol erfolgt eine 1 h Inkubation in 1 : 1 Epon (*Plano*): Ethanol Mischung bei 6 °C. Im Folgeschritt wird das Mischungsverhältnis auf 3 : 1 verändert. Nach einer weiteren 1 h Inkubation folgt eine 12 h Behandlung mit 100 % Epon. Die Inkubation setzt sich anschließend über 2 x 2 h bei Raumtemperatur in 100 % Epon fort. Die Polymerisation erfolgt bei 60 °C über 48 h in 100 % Epon.

Der Kunststoffobjektträger des Chamberslide Systems wird nach dem Ausschneiden in flüssigem Stickstoff abgesprengt. Die Proben werden mit dem Ultratrim (*Reichert*) getrimmt und anschließend Semi- (1  $\mu\text{m}$ ) und Ultradünnschnitte (100 nm) am Ultracut (*Reichert*) angefertigt. Es folgt eine Färbung der Semidünnschnitte mit einer Färbelösung nach Richardson (*Merck*) und eine Kontrastierung am Ultrastainer

### 3 Material und Methoden

(*Leica Microsystems*) mit 0,2 % Bleicitrat (*Leica Microsystems*) und 0,5 % Uranylacetat (*Leica Microsystems*).

Die Betrachtung erfolgt an einem Elektronenmikroskop 109 der Firma Zeiss (Abbildung 32).

Die Bilder werden mit Hilfe von Xara Photo und Graphic Designer (*Xara Group Ltd*) und Pixelmator (*Pixelmator Team*) in Helligkeit und Kontrast nachbearbeitet.



Abb. 32  
Elektronenmikroskop 109 (*Carl Zeiss*)

#### 3.2.1.10 Übersicht Verlaufsplan Zellkultur

Versuchsansatz Hauptversuch Tag 1 – 10

- |         |                                                                                                                                                                  |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tag 1   | Auftauen der Zellen P1 3 Kryoröhrchen und Ausplattieren auf 4 große Zellkulturfalschen P2, Inkubation                                                            |
| Tag 2   | Inkubation                                                                                                                                                       |
| Tag 3   | Mediumwechsel und Inkubation                                                                                                                                     |
| Tag 4/5 | Inkubation                                                                                                                                                       |
| Tag 6   | 2 große Flaschen P2 Mediumwechsel (Standard - Zellkulturmedium) (- E)<br>2 große Flaschen P2 Mediumwechsel (Standard - Zellkulturmedium) + 283 µl Endorem® (+ E) |

### 3 Material und Methoden

- Tag 7
- 4 große Flaschen waschen und ablösen (2 x (- E), 2 x (+ E))  
Zellen auszählen und Ansatz für Hauptversuch
- MTT Test,  $9,5 \times 10^3$  Zellen pro Well (entspricht  $5 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung einer 24 Well Platte mit  $1,9 \text{ cm}^2$  Wells), je 3 Wells (+ E) und (- E) pro Tag, Tag 1, 2, 3 mit  $500 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium, 3 Eppendorfröhrchen mit  $9,5 \times 10^3$  Zellen und  $300 \mu\text{l}$  Medium
  - Berliner Blau Färbung,  $47,5 \times 10^3$  /  $65,5 \times 10^3$  Zellen pro Well (entspricht  $25 \times 10^3$  /  $30 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung einer 24 Well Platte mit  $1,9 \text{ cm}^2$  Wells), je 2 Wells (+ E) und (- E) pro Konzentration in  $500 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium
  - Phalloidin Färbung,  $47,5 \times 10^3$  /  $65,5 \times 10^3$  Zellen pro Well (entspricht  $25 \times 10^3$  /  $30 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Verwendung einer 24 Well Platte mit  $1,9 \text{ cm}^2$  Wells), je 2 Wells (+ E) und (- E) pro Konzentration in  $500 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium
  - Life Cell, Culture - Insert mit  $35 \times 10^3$  Zellen (+ E) pro Kavität mit jeweils  $70 \mu\text{l}$  Standard - Zellkulturmedium
  - ELO / TEM, Chamber Slide, 4 Kavitäten mit jeweils  $100 \times 10^3$  Zellen pro Kavität, 2 x (+ E), 2 x (- E), mit jeweils 1 ml Standard - Zellkulturmedium
  - Implantation der Zellen in Kniedefekte, MRT Kadaver Studie:  
 $0,5 \times 10^5$ ,  $4,75 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^5$  Zellen pro ml Gel  
Ansatz mit jeweils doppelter Zellzahl pro ml DMEM mit  $0,1 \text{ ml}$  Lösungsmittel
  - 1 große Flasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) mit P2 (- E) für Life Cell am Folgetag
  - Restzellen (+ E) P1 weggefroren mit  $2 \times 10^6$  Zellen pro Kryotube (-  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ )
  - MTT Tag 0
- Tag 8
- Starten vom Life Cell (+ E)
  - Chamber Slide für ELO / TEM mit Yellow Fix fixiert
  - Berliner Blau Färbung
  - Phalloidin Färbung
  - MTT Tag 1
  - Kryotubes (+ E) P1 vom (-  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) Kühlschrank in flüssigen Stickstoff

### 3 Material und Methoden

- 1 große Flasche (75 cm<sup>2</sup>) abgelöst und für Life Cell (– E) (35 x 10<sup>3</sup> Zellen / Kavität) in das Culture - Insert eingesetzt
- Tag 9
- MTT Tag 2
  - Life Cell (+ E) beendet
  - Life Cell (– E) gestartet
- Tag 10
- MTT Tag 3
  - Life Cell (– E) beendet

#### 3.2.2 MRT Messung (Kadaverstudie)

##### 3.2.2.1 Knorpeldefekt

Die Untersuchung schließt 20 Kniegelenke von 10 euthanasierten Hunden mit einem Gewicht von mehr als 20 kg, jeden Alters, Rasse und Geschlechtes, die in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen behandelt wurden, ein.

Die Gliedmaßen werden post mortem im Hüftgelenk abgesetzt und bei – 20 °C bis zum Zeitpunkt des Versuches tiefgefroren gelagert. Ausgeschlossen von der Studie werden Tiere mit bekannten pathologischen Veränderungen im Kniegelenk oder Wunden im Bereich der Hintergliedmaße. Hierfür werden von allen Kniepräparaten mediolaterale und kraniokaudale Röntgenbilder angefertigt und das Gelenk bei Eröffnung und Setzen des künstlichen Defektes makroskopisch begutachtet.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur über 12 h und anschließender Erwärmung in einem Wasserbad bei 34 °C (*EHEIM GmbH u. Co KG*) wird das Kniegelenk lateral chirurgisch eröffnet und im kaudomedialen Bereich des lateralen Femurkondylus ein Knorpeldefekt mittels eines 5,6 mm Zylinder Bohrers (*HSS Emil Lux GmbH u Co. KG*), ca. 5 mm Tiefe (h) geschaffen (Abbildung 33 und 34). Der Defekt wird mit steriler Kochsalzlösung (*Braun*) gespült und mit Hilfe eines Zigarettentupfers von Flüssigkeitsresten befreit. Es folgt die Implantation des Gelgemisches.



$$\text{Volumen} = \text{Höhe} \times \pi \times \text{Radius}^2$$

$$V = h \times \pi \times r^2$$

$$V = 5 \text{ mm} \times \pi \times (2,53 \text{ mm})^2$$

$$V \approx 123,15 \text{ mm}^3$$

$$V = 123,15 \text{ } \mu\text{l} \approx 0,12 \text{ ml}$$

Abb. 33

Zylindervolumen

V = Volumen; h = Höhe; r = Radius; mm = Millimeter

(modifiziert nach <http://www.mathematik-wissen.de>)



Abb. 34  
Eröffnetes Kniegelenk mit künstlich gesetztem, kreisrunden Knorpeldefekt im kaudomedialen Bereich des lateralen Kondylus.

#### 3.2.2.2 Herstellung des zellhaltigen Kollagengels

Die mit Endorem<sup>®</sup> markierten, abgelösten Zellen, Accutase und das Standard - Zellkulturmedium werden nun aus der Flasche abgesaugt und in einem 50 ml Falconröhrchen bei 260 g. über 5 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml reinem DMEM resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer der Zellgehalt pro ml bestimmt. In vier 2 ml Eppendorf- röhrchen werden 0,9 ml DMEM mit den verschiedenen Zellkonzentrationen bereitgestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4 Implantat, Gel - Zusammensetzung und Zell - Konzentrationen

Zell- Konzentration	Zellen pro ml Gel	Zellen in 0,9 ml DMEM	Kollagen - NF <sup>®</sup>	20GNL <sup>®</sup>
1	$0,00 \times 10^5$	$0,00 \times 10^6$	1 ml	0,1 ml
2	$0,50 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$		
3	$4,75 \times 10^5$	$9,50 \times 10^6$		
4	$10,00 \times 10^5$	$20,00 \times 10^6$		

ml = Milliliter; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium (*Gibco life technologies*);

Kollagen -NF<sup>®</sup> = Kollagen Typ I (*Amedrix*); 20GNL<sup>®</sup> = Neutralisationslösung (*Amedrix*)

### 3 Material und Methoden

Kollagen-NF<sup>®</sup> und 20GNL<sup>®</sup> werden 24 h vor der geplanten Implantation schonend aufgetaut. Die ersten 12 h werden sie bei 6 °C im Kühlschrank (*Liebherr*) aufbewahrt und anschließend das Kollagen-NF<sup>®</sup> 12 h bei Raumtemperatur, das 20GNL<sup>®</sup> weiterhin bei 6 °C gelagert.

Mit der 1ml BD-Spritze<sup>®</sup> und einer Kanüle (Sterican x 2,1 mm x 80 mm) (*Braun*) wird sehr langsam 1 ml Kollagen-NF<sup>®</sup>, möglichst Luftblasen frei, aufgezogen. Um einen Druckausgleich während des Aufziehens im Vial zu ermöglichen, wird eine zweite Kanüle (*Braun*) durch den Gummistopfen eingestochen. Wenige Minuten vor der geplanten Implantation wird die Zellsuspension in einer Verdünnung von 1 : 10 mit der 20GNL<sup>®</sup> vermischt. Um ein Endvolumen von 1 ml zu erhalten, werden somit die bereits vorbereiteten 900 µl Zellsuspension mit 100 µl 20GNL<sup>®</sup> vermischt. Zellsuspension und 20GNL<sup>®</sup> werden nun ebenfalls aus dem 2 ml Eppendorfröhrchen in eine 1 ml BD-Spritze<sup>®</sup> aufgezogen. Beide Spritzen (1 x Kollagen-NF<sup>®</sup> und 1 x 20GNL<sup>®</sup> / Zellsuspension) werden in den Twin - Syringe Dispenser<sup>®</sup> (*Amedrix*) eingesteckt. Die Spritzen werden an ihren Enden mit dem Schraubadapter, Single Use Adapter<sup>®</sup> (*Amedrix*), fest miteinander verbunden. Auf diesen wird nun ein Mischadapter, Single Use Mixer<sup>®</sup> (*Amedrix*) aufgesetzt und eine 18 G Kanüle (Neoject x 1,20mm x 40mm) (*Dr. Junghans GmbH*) zur Injektion verwendet (Abbildung 35).



Abb. 35

*Amedrix Matrix System ChondroFiller liquid*<sup>®</sup>:

Oben: 2 Vial, links 20GNL<sup>®</sup> (*Amedrix*), rechts Kollagen-NF<sup>®</sup> (*Amedrix*)

Unten: 1 ml BD-Spritzen (*Amedrix*) im Twin - Syringe Dispenser<sup>®</sup> (*Amedrix*) eingespannt mit aufgesetztem Single Use Adapter<sup>®</sup> (*Amedrix*) und Single Use Mixer<sup>®</sup> (*Amedrix*), sowie 18 G Kanüle (*Dr. Junghans GmbH*)

### 3.2.2.3 Implantation des Zell - Gelgemisches

Die ersten inhomogenen Tropfen des Gelgemisches werden verworfen und anschließend der trockene, artifizielle Defekt zügig mit der Mischung aufgefüllt. Die Kollagen-NF<sup>®</sup> / 20GNL<sup>®</sup> / Zellsuspension geliert innerhalb von ca. 5 min, in dieser Zeit wird das eröffnete Kniegelenk möglichst ruhig und mit aufrecht stehendem Defekt fixiert. Trübt sich das eingebrachte Gel und nimmt einen stabilen Zustand an, wird das Kniegelenk standardmäßig chirurgisch verschlossen.

Tabelle 5 Aufteilung der Fettgewebeproben (Hd 1-5), Konzentrationen (Konz 1-4) und der Kniegelenke (a1/2 - j1/2) als randomisiertes Blockdesign

	Hd 1	Hd 2	Hd 3	Hd 4	Hd 5
Konz 1	Knie a1	Knie i1	Knie d1	Knie d2	Knie e2
Konz 2	Knie j2	Knie b2	Knie c1	Knie g2	Knie b1
Konz 3	Knie e1	Knie j1	Knie f1	Knie h2	Knie i2
Konz 4	Knie g1	Knie f2	Knie a2	Knie c2	Knie h1

Konz = Konzentration; Hd = Hund (Fettspender); a - j 1 = rechts; a - j 2 = links; a - j Knie von Spender 1 - 10

### 3.2.2.4 Wundverschluss

Kapsel, Faszie, Unterhaut und Haut werden standardgemäß verschlossen und das Kniegelenk anschließend mit 0,5 l steriler (37 °C) Sterofundin<sup>®</sup> Infusionslösung (*Braun*) über zwei Injektionsnadeln 18 G (*Braun*) unter manueller Flexion und Extension gespült. Dies dient der Minimierung von Artefakten durch eingeschlossene Gasbläschen in der MRT Untersuchung.

### 3.2.2.5 Magnetresonanztomographische Messungen

Die MRT Untersuchung der präparierten Kniegelenke erfolgt mit Hilfe eines Magnetresonanztomographen Gyroscan Intera (*Philips Medical System GmbH*) (Abbildung 36) mit einer Magnetfeldstärke von 1 Tesla. Zum Signalempfang wird eine Oberflächen - Empfangsspule (C3) (*Philips Medical System GmbH*) (Abbildung 37) genutzt.

Die Knie werden in einer waagerechten Position lateral gelagert. Das Kniegelenk weist in dieser Stellung eine ungefähre Beugung von 90 ° auf. Der proximale Anteil der Gliedmaße befindet sich hierbei dem Tomographen abgewandt.

### 3 Material und Methoden

Aus hygienischen Gründen befinden sich die Gliedmaßen in Plastikfolie verpackt. Sie werden mit Hilfe von Schaumstofflagerungshilfen positioniert und mit den am MRT befindlichen Fixier – Bändern stabilisiert. Die C3 Oberflächenspule wird zentral unter dem Kniegelenk platziert (lateral anliegend), so dass der zu untersuchende Gelenkabschnitt im Zentrum der Spule zu liegen kommt.

Im Vorfeld der Arbeit durchgeführte Untersuchungen bilden die Grundlage für die verwendeten Sequenzparameter.

Die bei der Untersuchung gewonnen Rohdatensätze werden mit Hilfe einer MRT spezifischen Philips – Software rekonstruiert und nachbearbeitet. Die weitere Bearbeitung und Messung der Signalintensitäten sowie der Defektgrößen erfolgt mit OsiriX Imaging Software Version 4.1.2 (*Pixmeo SARL*).



Abb. 36  
MRT System der *Firma Philips Medical System*, 1 Tesla



Abb. 37  
C3 Oberflächenspule der *Firma Philips Medical System*

### Sequenzen

Das Untersuchungsprotokoll der Kniegelenke enthält 7 unterschiedliche Sequenzen. Eine sagittal orientierte T1 – gewichtete, eine dorsal orientierte T2 - gewichtete, sowie zwei sagittal orientierte T2\* – gewichtete Sequenzen (TurboSpinecho- kurz TSE) mit Schichtdicken von 2 mm und 3 mm. Die T2\*- gewichteten Sequenzen (Fast field echo- kurz FFE) eignen sich durch ihre hohe Empfindlichkeit für

### 3 Material und Methoden

Magnetfeldinhomogenitäten besonders zur Detektion von Eisenoxidpartikeln. Zur anatomischen Übersicht wird eine sagittal orientierte Protonendichte - gewichtete Sequenz durchgeführt und durch eine transversal orientierte 3D WATS (wasserselektive Sequenz) zur Knorpeldarstellung ergänzt (Tabelle 6).

Für alle 20 Untersuchungen werden identische Voreinstellungen verwendet.

Die für die Studie wichtigsten Sequenzparameter werden in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6 Übersicht über die ausgewählten Sequenzparameter

<b>Sequenz</b>	<b>Orien- tierung</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>TR (ms)</b>	<b>Matrix</b>	<b>Field of View (mm)</b>	<b>Schichtdicke (mm)</b>
<b>T1wTSE</b>	Sagittal	22	500	320	190	2
<b>T2 TSE</b>	Dorsal	60	1490	288	150	1-3
<b>T2*w3D</b>	Sagittal	10	20	256	160	3
<b>FFE</b>						
<b>T2*w 3D</b>	Sagittal	10	20	288	160	2
<b>FFE</b>						
<b>T2w</b>	Dorsal	60	2600	512	190	2
<b>SPAIR</b>						
<b>PDw</b>	Sagittal	11	1500	304	190	2
<b>3D Wats</b>	Trans- versal	13	25	256	150	2

TE = Echozeit; TR = Repetitionszeit; ms = Millisekunden; mm = Millimeter; min = Minuten; sec = Sekunden

#### **Untersuchungsgang**

Zu Beginn der MRT Untersuchung wird das Kniegelenk als zu untersuchender Bereich definiert. Hierzu wird das Knie mit Hilfe der Positionierungshilfe im Zentrum des Tomographen platziert. Anschließend werden zur Planung der drei Ebenen kurze Übersichtsaufnahmen (sogenannte Surveys) durchgeführt. Die Ausrichtung der sagittal orientierten Sequenzen erfolgt anhand der Patellarsehne und der Femurkondylen. Die transversale Ebene wird ebenfalls an den Femurkondylen, orthograd zur sagittalen Ebene geplant. In der dorsalen Ebene wird auf eine möglichst parallele Ausrichtung der Femurkondylen geachtet.

### 3 Material und Methoden

Bei allen verwendeten Sequenzen wird stets berücksichtigt, dass mindestens drei Schichten in Folge den Defekt darstellen, wobei eine Schicht genau zentral durch den Defekt verläuft.

#### Messung

Nach der Durchführung aller 20 Untersuchungen werden die Messungen im Software Programm Osirix 4.1.2 durchgeführt. Die Messungen erfolgen geblindet, in einer zufälligen Reihenfolge und unter immer gleichen Bedingungen.

In den sagittal orientierten T2\* - gewichteten (FFE) – (Schichtdicke 2 mm) und T1 - gewichteten Sequenzen wird in einem mittig durch den artifizien Defekt reichenden Schnitt ein 6 – eckiges Polygon, sogenannte *Region of Interest* (ROI) im Bereich des Defektes platziert. Das Polygon wird so gestaltet, dass es den Defekt maximal ausfüllt. Ein identische ROI - Polygon wird zur Normierung der Werte im Außenbereich, neben dem Knie, platziert. Ein der ROI benachbartes Datenfeld gibt Auskunft über Flächengröße (Area), Mittelwert, Minimal- und Maximalwert der Signalintensitäten, sowie Standardabweichung und Außenlänge des Polygon (Abbildung 38). Alle 20 Gliedmaßen werden in ausgewählten Sequenzen jeweils 2 fach vom selben Untersucher ausgemessen.

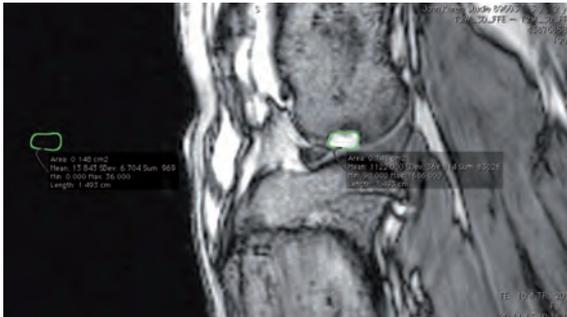


Abb. 38

T2\* – gewichteter (3D) FFE Schnitt mit einer Schichtdicke von 2 mm. In grüner Farbe sind die eingefügten *Region of Interests* markiert. Diese werden sowohl im Defekt als auch im Außenbereich platziert. Die benachbart dargestellten Datenfelder enthalten Informationen zur Flächengröße der Area, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert der Signalintensitäten, sowie Standardabweichung und Außenlänge des Polygons.

Sowohl in den sagittal, als auch in den transversal orientierten Schnitten wird der Condylus in 3 gleich große Areale aufgeteilt und die Lage des Defektes beurteilt.

### 3 Material und Methoden

Eine zweite Messung erfolgt auf Grund von subjektiver Auswertung der Bilder. Hierbei wird ebenfalls in einem sagittal orientierten T2\* - gewichteten Schnittbild (2 mm Schichtdicke) eine ROI im Defekt platziert. Anhand der Daten aus den anderen Sequenzen wird jedoch nur ein ROI Bereich ausgewählt, der zweifelslos das Gelimplantat darstellt und keine sichtbaren Luftbläschen enthält. Die Größe der gewählten ROI entspricht in diesem Fall nicht der maximalen Defektgröße im MR – Bild. Die Form des gewählten Polygons verhält sich in diesem Fall unterschiedlich und wird durch den Untersucher an die Gegebenheiten des Präparates angepasst. Ein identisches Polygon wird neben dem Knie im Außenbereich zur Normierung der Werte platziert (Abbildung 39).

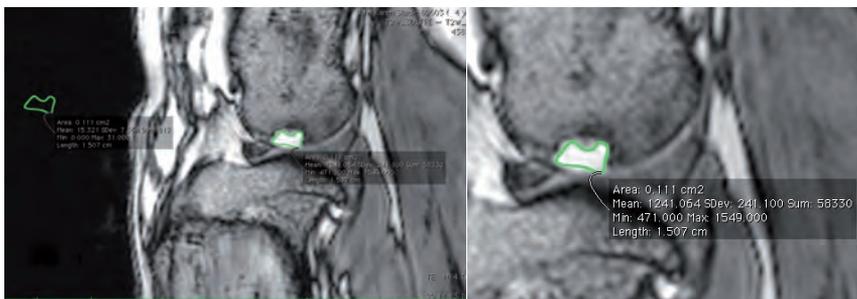


Abb. 39

T2\* – gewichteter (3D) FFE Schnitt mit einer Schichtdicke von 2 mm. In grüner Farbe sind die eingefügten *Region of Interests* markiert. Diese werden in der vorliegenden subjektiven Messung den Gegebenheiten des Präparates angepasst. Die benachbart dargestellten Datenfelder enthalten Informationen zur Flächengröße der Area, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert der Signalintensitäten, sowie Standardabweichung und Außenlänge des Polygons.

Links: Übersicht, Rechts: Vergrößerung des Messbereiches innerhalb des Defektes

### 3.2.3 Ergänzende Untersuchungen

#### 3.2.3.1 Zellauswanderung aus dem Gelpellet im Life Cell Imaging

Die verwendeten Zellpopulationen (Hd 04/13, Hd 11/13, Hd 16/13) werden aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut und je nach zuvor gefrorener Zellmenge auf 3 - 4 große Zellkulturflaschen aufgeteilt. Haben sie nach der Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) eine ausreichende Zelldichte von 80 % bedeckter Fläche erreicht, werden sie über 24 h mit 283 µl Endorem® und 9,717 ml DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S inkubiert. Es erfolgen ein weiterer Mediumwechsel mit Standard - Zellkulturmedium und eine erneute Inkubation über 24 h. Die Zellen werden mit Accutase (PAA) nach dem bereits beschriebenen Verfahren abgelöst, ausgezählt und eine Anzahl von  $1 \times 10^6$  in jeweils

### 3 Material und Methoden

450 µl reinem DMEM und 50 µl 20GNL<sup>®</sup> gelöst. Per Mischspitze wird dies nun mit 500 µl Kollagen-NF<sup>®</sup> in Form von ca. 0,5 - 0,8 cm großen Pellets über eine 18 G Kanüle in eine Plastikpetrischale gegeben (Abbildung 40).

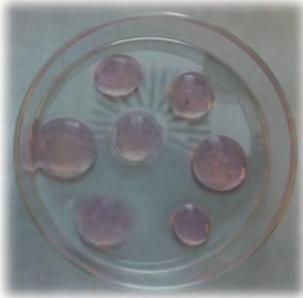


Abb. 40

Versuchsansatz für die Untersuchung der Zellauswanderung aus dem Gelpellet, 0,5 - 0,8 cm große Gel-Zellpellets auf einer Petrischale

Die Pellets werden mit Standard - Zellkulturmedium bedeckt und die Schale in die Inkubationskammer des Life Cell Mikroskopes, Axioobserver (Zeiss) verbracht. Im Bereich einer klaren Gel / Zellgrenze (Abbildung 41) gegenüber der nicht bewachsenen Platte (Pelletaußenbereich) wird der Fokus platziert und die Serienaufnahme mit 1 Bild pro 10 min gestartet. Die gesamte Beobachtungsdauer betrug bei allen 3 Proben mindestens 48 h Laufzeit (Tabelle 7).

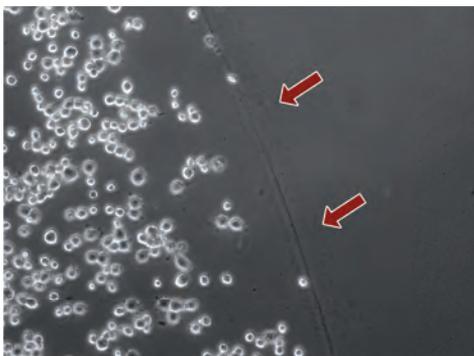


Abb. 41

Phasenkontrast Aufnahme zum Start des Life Cell - Auswanderungsversuches aus dem Gelpellet. Die Zellen befinden sich im Gelpellet auf der linken Seite. Die Grenze des Gels zum umliegenden Standard - Zellkulturmedium ist klar erkennbar (→).

### 3 Material und Methoden

Tabelle 7 Zellauswanderung aus dem Gelpellet, Übersichtstabelle

Datum	Probe	Life Cell Dauer	Gel Menge	Konz. Gel	Medium	Passage
11.12.13	Hd 11/13	48 h	1 ml	1 Mio/ml	DMEM, 10%FBS, 1%P/S	P3
13.12.13	Hd 16/13	80 h	1 ml	1 Mio/ml	DMEM, 10%FBS, 1%P/S	P3
19.12.13	Hd 4/13	100 h	1 ml	1 Mio/ml	DMEM, 10%FBS, 1%P/S	P3

Hd = Hund (Fettpender); h = Stunden; ml = Milliliter; Mio = Millionen; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium (*Gibco life technologies*); FBS = Fetales Bovines Serum (*PAA*); P/S = Penicillin/Streptomycin (*AppliChem*); P3 = Passage 3; Konz = Konzentration der Zellen

#### 3.2.3.2 Zytotoxizitätstest im Life Cell Imaging (20GNL<sup>®</sup>)

Im Hauptversuch wurden die im DMEM gelösten Zellen unmittelbar vor dem Implantieren mit der 20GNL<sup>®</sup> Neutralisationslösung (Abbildung 42) im Verhältnis 1 : 10 gemischt und anschließend 1 : 1 mit dem Kollagen-NF<sup>®</sup> in den Defekt eingebracht.

In einem Zytotoxizitätstest im Life Cell Mikroskop wird die toxische Wirkung des 20GNL<sup>®</sup> in einer 1 : 10 Verdünnung mit DMEM auf die ADMSCs getestet.

Die Zellen (Hd 16/13) werden in der P3 in einer Konzentration von  $22 \times 10^3$  Zellen in der Kavität der Zellkulturschale viergeteilt (*Greiner bio-one*) (entspricht  $23,656 \times 10^3$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ) ausgesät und über 3 Tage mit Standard - Zellkulturmedium im Brutschrank inkubiert (Abbildung 43). Bei einer Besiedlung von 80 % der Kavität wird das Standard - Zellkulturmedium verworfen und durch 100  $\mu\text{l}$  einer 1 : 10 verdünnten 20GNL<sup>®</sup> / DMEM Mischung ersetzt. Die Petrischale wird nun in die Inkubationskammer des Life Cell Mikroskops verbracht. Die Veränderungen der Zellkultur werden anschließend über 24 h dokumentiert (ersten 2 h 1 Bild pro min, 2 h – 24 h 1 Bild pro 5 min).

### 3 Material und Methoden



Abb. 42  
Vial 20GNL<sup>®</sup> Neutralisations-  
lösung (Amedirx)

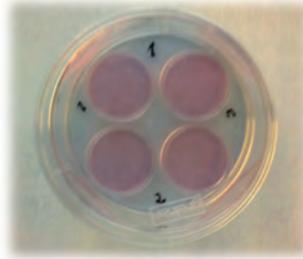


Abb. 43  
Versuchsansatz Zytotoxizitätstest  
20GNL<sup>®</sup> (Amedrix)  
Petrischale mit vier Kavitäten  
(Greiner bio-one)

#### 3.2.3.3 MTT Vergleichstest

##### (LM (20GNL<sup>®</sup>); DMEM; Standard - Zellkulturmedium)

Die Zellen der Passage 2 von Hd 4/13, Hd 11/13 und Hd 16/13 werden nach 3 maligem Waschen mit PBS Pufferlösung mit dem bereits beschriebenen Accutase Verfahren abgelöst und ausgezählt.

Die Zellen ( $114 \times 10^3$ ) werden in einer Konzentration von  $100 \times 10^3$  Zellen / ml in

a) DMEM, 20GNL<sup>®</sup> 10 : 1

b) DMEM

c) DMEM, 10% FBS, 1% P/S

über 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend über 5 min bei 260 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen und das Pellet in 120 µl DMEM, 10% FBS, 1% P/S gelöst (je  $9,5 \times 10^3$  Zellen in 10 µl Standard - Zellkulturmedium).

In einer 24 Well Platte werden je 3 Wells mit a) b) und c) Zellen von Hd 4/13, 11/13 und 16/13 befüllt ( $9,5 \times 10^3$  Zellen pro Well) und anschließend mit 500 µl Standard - Zellkulturmedium aufgefüllt (Abbildung 44). Die Proben werden für einen MTT Test von 3 Tagen (0h, 24h, 48h und 72h) zusammengestellt und nach dem oben beschriebenen Verfahren ausgewertet.

MTT Tag 1/2/3

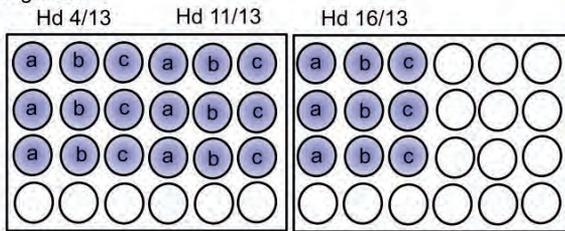


Abb. 44

Schematische Darstellung des Versuchsansatzes für den MTT Vergleichstest, pro Tag werden jeweils 2 Platten angesetzt, untersucht werden die Proben: Hd 4/13, Hd 11/13 und Hd 16/13

- a) DMEM (*Gibco life technologies*), 20GNL<sup>®</sup> (*Amedrix*) 10 : 1
- b) DMEM (*Gibco life technologies*)
- c) DMEM (*Gibco life technologies*), 10% FBS (*PAA*), 1% P/S (*AppliChem*)

#### 3.2.4 Statistische Planung und Auswertung

Die Planung der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Failing, Diplom Mathematiker, AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Microsoft Office Excel (*Microsoft Corporation*) verwendet. Die gewonnen Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Diplom Physiker Malte Pollmann erarbeitet.

##### 3.2.4.1 MTT Test

Die Einzelwerte der Dreifachmessung des MTT Testes zu den Messzeitpunkten (Tag 0 – 3) mit und ohne Endorem<sup>®</sup>- Markierung werden zu einem arithmetischen Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung zusammengefasst. Anschließend erfolgt die Bildung des Delta 1 zur sogenannten Blank Messung ( $D_1$ ). Werte, die nach dem Chi - Quadrat Test aus dem 90 % Normbereich der mittleren Standardabweichung fallen, werden aus der folgenden Messung im Sinne eines Ausreißers ausgeschlossen.

Aus den Delta  $D_1$  Werten ( $D_1 =$  arithmetischer Mittelwert – Blank) (Tag 0 - 3) wird durch Regression in erster Näherung für jede Probe eine Interpolationsgerade mit Determinationskoeffizient gebildet. Anhand der Steigung  $m$  (bei  $y = mx + b$ ) der Geraden kann eine Vergleichbarkeit der Proliferationskapazität vorgenommen werden. Diese wird sowohl im Hinblick auf Unterschiede zwischen Endorem<sup>®</sup> markierten und unmarkierten Zellen, als auch im Bezug auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben bewertet.

### 3 Material und Methoden

Unter Annahme einer statistischen Normalverteilung untersucht man die Werte der Proliferationskapazität ( $m$ ) nun in einem einseitigen Test auf die Nullhypothese  $H_0$ , nach der das Endorem<sup>®</sup> einen nachweisbaren negativen Einfluss auf den Anstieg der Absorptionsmesswerte und damit auf die Steigung  $m$  der Regressionsgraden hat.

Im Bezug auf die geringe Stichprobengröße bei Verwendung dieses Testes, erfolgt des Weiteren ein Test der Einzelmesswerte  $D_1$  zu jedem Messzeitpunkt mit der gleichen einseitigen Überprüfung auf die Nullhypothese  $H_0$ .

Interspezifisch werden die Steigungen  $m$  der Graden unter Einbeziehung des T - Varianztestes für verbundene Proben, sowie dem Pearson Korrelationstest statistisch ausgewertet. Untersucht werden soll in beiden Tests der Zusammenhang zwischen gemessenen Absorptionswert und Zellpopulation. Im Pearson Test belegt ein Wert zwischen  $0,8 < r \leq 1$  einen hohen Zusammenhang und somit eine Abhängigkeit der Proliferationskapazität von der verwendeten Zellpopulation.

Unter Berücksichtigung des einseitig verbundenen T - Varianztestes soll abschließend ein Vergleich der Einflüsse des Endorems im Bezug auf die verwendeten Spenderzellpopulationen erfolgen.

#### 3.2.4.2 Life Cell Imaging

Aus den jeweils 3 gemessenen Werten für die nicht besiedelte Fläche ergeben sich arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen. Aus den gewonnenen Daten werden Wachstumskurven für alle Proben erstellt. Charakteristisch kommt es zum Auftreten einer anfänglichen sogenannten Lag Phase, einer anschließenden linearen Wachstumsphase mit Beendigung dieser in einer sogenannten Sättigungsphase, in der eine vollständige Konfluenz der Zellen erreicht ist (Abbildung 45).

Anhand der normalisierten Wachstumskurven kann ein visueller interspezifischer Vergleich der Proben erfolgen. Des Weiteren werden nach Vorgabe der *Application note 30*, der Firma Ibidi GmbH die Bereiche des linearen Wachstums, die als charakteristisch für das Life Cell Imaging gelten, in Form von linearen Regressionsgraden wiedergegeben und statistisch analysiert.

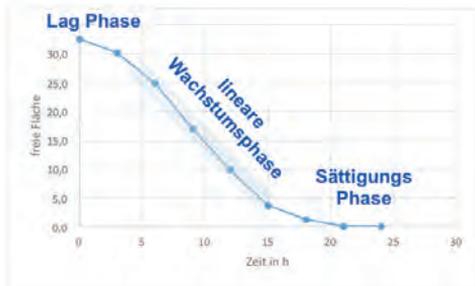


Abb. 45

Charakteristische Wachstumskurve der Zellen in der Live Cell Imaging Analyse. Dargestellt werden die typischen drei Phasen: Lag Phase, lineare Wachstumsphase und Sättigungsphase.

(modifiziert nach Application note 30 der Firma Ibidi GmbH)

Wie bereits beim MTT Test werden unter Annahme einer statistischen Normalverteilung die Werte der Migrations- und Proliferationskapazität ( $m$ ) in einem einseitigen Test auf die Nullhypothese  $H_0$  untersucht. Nach  $H_0$  hat das Endorem<sup>®</sup> einen nachweisbaren negativen Einfluss auf die Zellmigrationsfähigkeiten und das Wachstum und damit auf die Steigung  $m$  der errechneten Regressionsgraden.

Ebenfalls werden die Steigungen  $m$  der Graden interspezifisch unter Einbeziehung des T - Varianztestes für verbundene Proben, sowie dem Pearson Korrelationstest statistisch ausgewertet. Untersucht werden soll in beiden Tests der Zusammenhang zwischen gemessener frei Fläche und der verwendeten Stammzellpopulation. Im Pearson Test belegt ein Wert zwischen  $0,8 < r \leq 1$  einen hohen Zusammenhang und somit eine Abhängigkeit der Messergebnisse im Life Cell Imaging von der verwendeten Zellprobe.

Der einseitig verbundenen T - Varianztestes soll abschließend einen Vergleich der Einflüsse des Endorems<sup>®</sup> in Bezug auf die verwendeten Zellpopulationen erbringen.

#### 3.2.4.3 MRT

Die in den ROI gemessenen Signalintensitäten werden unter Berücksichtigung der Daten des jeweiligen Außenbereichs normiert. Es werden Gruppen der verschiedenen Zellkonzentrationen gebildet, sowie Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Anschließend werden die Daten statistisch auf einen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalintensität geprüft.

### 3 Material und Methoden

Verwendet wird ein modifizierter zweiseitiger Student – t – Test (Welch – Test), der sich für Proben mit unterschiedlichen Varianzen eignet.

Ebenfalls werden die Daten in einem Pearson Korrelationstest auf einen Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und Signalintensität geprüft.

#### 3.2.4.4 MTT Vergleichstest

Die statistische Auswertung des MTT Vergleichstest orientiert sich an der bereits zuvor beschriebenen Auswertung des MTT Tests.

Aus den Einzelwerten der Dreifachmessung werden der arithmetischen Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Es erfolgt die Bildung des Delta 1 ( $D_1$ ) zur sogenannten Blank Messung. Die Werte werden nach dem Chi - Quadrat Test auf den 80 % Normbereich der mittleren Standardabweichung getestet und bei Abweichung gegebenenfalls aus der folgenden Messung ausgeschlossen.

Aus den  $D_1$  Werten wird durch Regression in erster Näherung für jede Probe eine Interpolationsgerade mit Determinationskoeffizient gebildet. Anhand der Steigung  $m$  wird ein Vergleich der Proliferationskapazität vorgenommen.

Bewertet werden in einem Student - t - Test die Ergebnisse im Hinblick auf Unterschiede zwischen den in Lösungsmittel und in Standard – Zellkulturmedium inkubierten Zellen, sowie Abweichungen zwischen den in DMEM und Standard – Zellkulturmedium inkubierten Zellen. Der einseitige Test für verbundene Stichproben erfolgt unter Annahme einer statistischen Normalverteilung auf die Nullhypothesen  $H_{01}$  und  $H_{02}$ ).  $H_{01}$  - Die einstündige Inkubation in Lösungsmittel beeinflusst den Anstieg der Absorptionmesswerte (das Proliferationsverhalten) im Vergleich zum Standard – Zellkulturmedium negativ.  $H_{02}$  - Die einstündige Inkubation in DMEM beeinflusst den Anstieg der Absorptionmesswerte (das Proliferationsverhalten) im Vergleich zum Standard – Zellkulturmedium negativ.

Auf Grund der geringen Stichprobengröße erfolgt des Weiteren ein Test der Einzelmesswerte  $D_1$  zu jedem Messzeitpunkt mit der gleichen einseitigen Überprüfung auf die Nullhypothese  $H_0$ .

Interspezifisch werden die Steigungen  $m$  der Graden unter Verwendung des Pearson Korrelationstest statistisch ausgewertet. Untersucht wird der Zusammenhang zwischen gemessenen Absorptionswerten und Zellpopulation.

Im T - Varianztest soll abschließend ein Vergleich der Einflüsse des Lösungsmittels gegenüber dem Einfluss der verwendeten Zellpopulation erfolgen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Eisennachweis: Berliner Blau Färbung

Die aus dem Fettgewebe entnommen kaninen Stammzellen zeigen nach 24 stündiger Inkubation mit dem Eisenoxidpräparat Endorem® eine deutliche Eisenaufnahme in der Berliner Blau Färbung. Auch nach der Markierung kommt es zu einem Anwachsen der Kultur auf den Glasplättchen in der 24 Well Platte und einer Konfluenz der Zellen in den Wells zu etwa 70 % (35.000 Zellen / cm<sup>2</sup> Ansatz). Bei allen fünf Versuchspopulationen kann eine Aufnahme der Eisenoxidpartikel in das Zytoplasma lichtmikroskopisch beobachtet werden. Die Präparate zeigen jedoch bei allen Versuchspopulationen ein heterogenes Bild. Der überwiegende Teil der Zellen zeigt eine deutliche Aufnahme an Eisen, wie in Abbildung 46 und 47 zu sehen ist. Hier liegen die Partikel sowohl einzeln als auch in großen Konglomeraten im gesamten Zytoplasma verteilt vor. Es finden sich jedoch auch eine geringe Anzahl an Zellen, die nur vereinzelte Partikel enthalten. Diese wiederum befinden sich vermehrt im perinukleären Bereich.

Die Morphologie der Zellen zeigt keine Auffälligkeiten im Vergleich zur negativ Kontrolle (Abbildungen 48, 49 und 50, 51). Die Zellen weisen, wie auch die Vergleichszellen, eine spindelförmige bis polygonale Morphologie auf und bilden einen zusammenhängenden Zellverband.

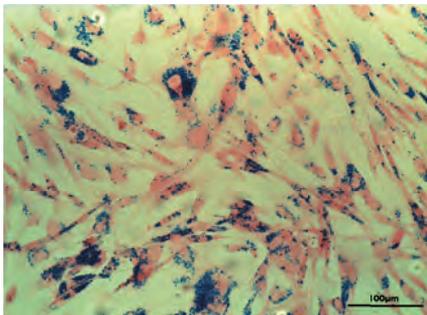


Abb. 46  
Berliner Blau Färbung, Hd 16/13 + E (10er Vergrößerung)  
Endorem® markierter Zellverband. Die Zellen zeigen zum Teil eine hochgradige Aufnahme an blau markierten Eisenoxidpartikeln in das Zytoplasma.  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

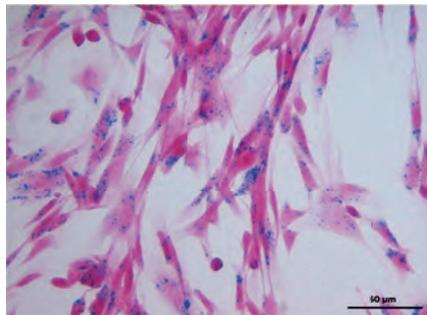


Abb. 47  
Berliner Blau Färbung, Hd 6/13 + E (20er Vergrößerung)  
Endorem® markierter Zellverband. Es zeigen sich spindelförmige bis polygonale Zellen, die unterschiedliche Mengen an Eisenoxidpartikeln in ihr Zytoplasma aufgenommen haben.  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

## 4 Ergebnisse

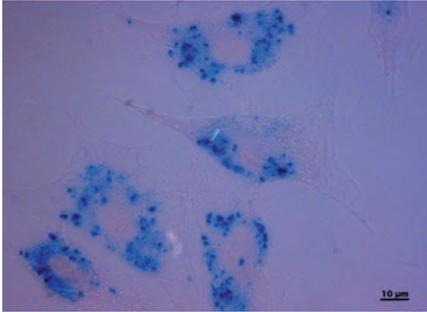


Abb. 48  
Berliner Blau Färbung, Hd 7/13 + E (40er Vergrößerung)

In den spindelförmig bis polygonalen Zellen zeigen sich vor allem im Bereich um die Zellkerne multiple Ansammlungen von blau gefärbten Eisenpartikeln.

Hd = Hund; + E = Endorem<sup>®</sup> markiert; µm = Mikrometer

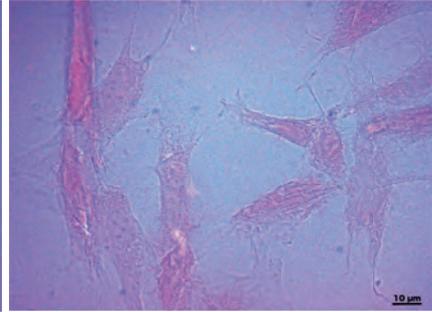


Abb. 49  
Berliner Blau Färbung, Hd 7/13 - E (40er Vergrößerung)

Es zeigen sich spindelförmige bis polygonale Zellen.

Hd = Hund; - E = nicht Endorem<sup>®</sup> markiert; µm = Mikrometer

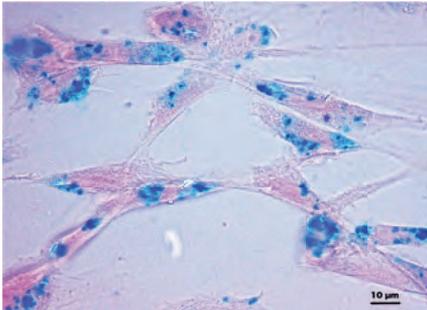


Abb. 50  
Berliner Blau Färbung, Hd 4/13 + E (40er Vergrößerung)

In den spindelförmig bis polygonalen Zellen zeigen sich vor allem im Bereich um die Zellkerne multiple Ansammlungen von blau gefärbten Eisenpartikeln.

Hd = Hund; + E = Endorem<sup>®</sup> markiert; µm = Mikrometer

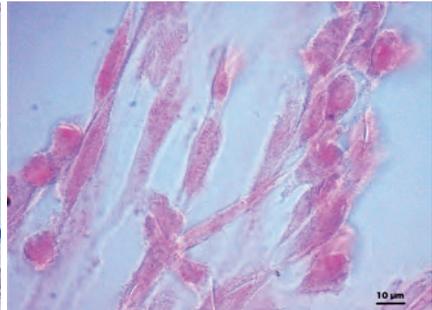


Abb. 51  
Berliner Blau Färbung, Hd 4/13 - E (40er Vergrößerung)

Es zeigen sich spindelförmige bis polygonale Zellen.

Hd = Hund; - E = nicht Endorem<sup>®</sup> markiert; µm = Mikrometer

### 4.2 Vitalitätstests

#### 4.2.1 Phalloidin Fluoreszenzfärbung

In der Phalloidin Färbung zeigen sich alle Zellen der Proben (Hd 4/13, 6/13, 7/13, 11/13, 16/13) als spindelförmige bis polygonale Strukturen mit ein bis zwei gut nachvollziehbaren Zellkernen (blau markiert) (Abbildungen 52 - 55). Das Zytoskelett ist bei den Endorem<sup>®</sup> markierten und unmarkierten Zellen anhand der grün gefärbten sehr feinen Aktinfilamente eindeutig dargestellt und über das gesamte Zytoplasma nachvollziehbar. Die Filamente zeigen bei allen Proben ein geordnetes und annähernd parallelverlaufendes Muster. Während die Eisenpartikel in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildungen 52, 53, 54, 56 und 58) verborgen bleiben und die markierten Zellen nicht von der negativ Kontrolle (Abbildung 55 und 60) zu unterscheiden sind, kann in der Phasenkontrastmikroskopie dieser Phalloidin gefärbten Objektträger eine eindeutige Zuordnung vorgenommen werden. In Abbildungen 57 und 59, die denselben Ausschnitt darstellen wie Abbildungen 56 und 58, erkennt man eine deutliche Schattierung im Bereich der eingelagerten Endorem<sup>®</sup>- Partikel. Die negativ Kontrolle in Abbildung 61 weist hingegen keine Einlagerungen in diesem Bereich des Zytoplasmas auf. Die Endorem<sup>®</sup> markierten Zellen besitzen eine vergleichbare Größe wie die unmarkierten Zellen. Sowohl der Zellkern als auch die Erkennbarkeit von Kernkörperchen sind in allen Präparaten identisch. Zusammenfassend kann in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung kein Unterschied zwischen Endorem<sup>®</sup> markierten und unmarkierten Zellen festgestellt werden.

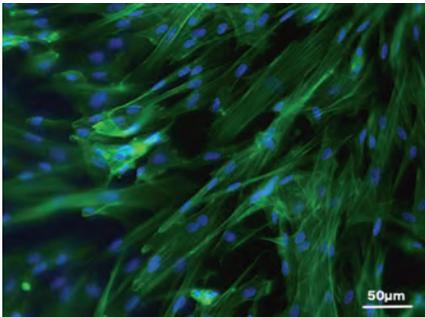


Abb. 52  
Phalloidin Färbung, Hd 4/13 + E (20er Vergrößerung), Übersichtsaufnahme, Die spindelförmig bis polygonalen Zellen zeigen einen zusammenhängenden Zellverband  
Hd = Hund; + E = Endorem<sup>®</sup> markiert;  $\mu\text{m}$  = Mikrometer

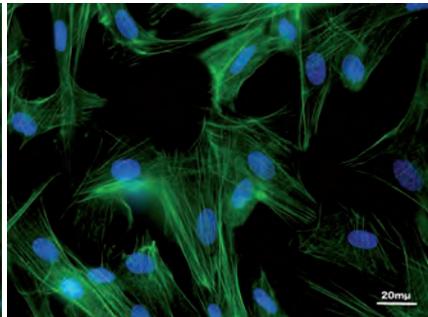


Abb. 53  
Phalloidin Färbung, Hd 11/13 + E (40er Vergrößerung),  
Die spindelförmig bis polygonalen Zellen zeigen einen zusammenhängenden Zellverband  
Hd = Hund; + E = Endorem<sup>®</sup> markiert;  $\mu\text{m}$  = Mikrometer

## 4 Ergebnisse

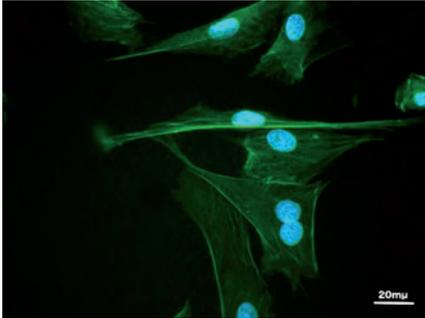


Abb. 54  
Phalloidin Färbung, Hd 6/13 + E (40er Vergrößerung).  
Die Zellen zeigen ein gut ausgeprägtes, intaktes Zytoskelett (grün) und 1-2 Zellkerne mit Kernkörperchen (blau).  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

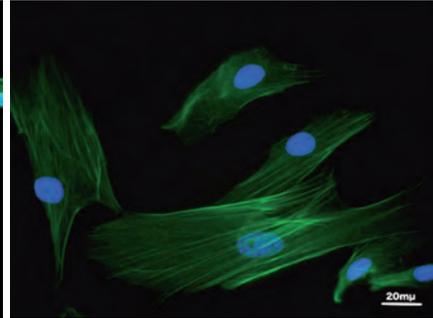


Abb. 55  
Phalloidin Färbung, Hd 6/13 - E (40er Vergrößerung)  
Grün: Das Zytoskelett bildende, annähernd parallel verlaufende Aktinfilamente  
Blau: Zellkerne mit Kernkörperchen  
Hd = Hund; - E = nicht Endorem® markiert; µm = Mikrometer

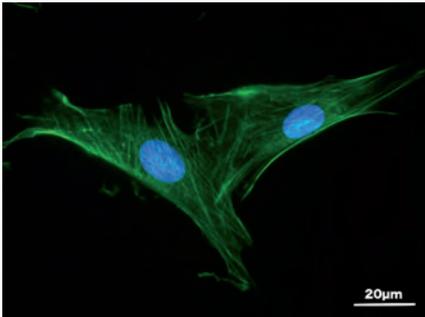


Abb. 56  
Phalloidin Färbung, Hd 7/13 + E (63er Vergrößerung)  
Es zeigen sich zwei polygonale in Verbindung stehende Stammzellen. Die Zellkerne sind blau markiert, das Zytoskelett in Form der Aktinfilamente stellt sich grün dar. Innerhalb des Zytoplasmas sind keine Eisenpartikel zu erkennen.  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

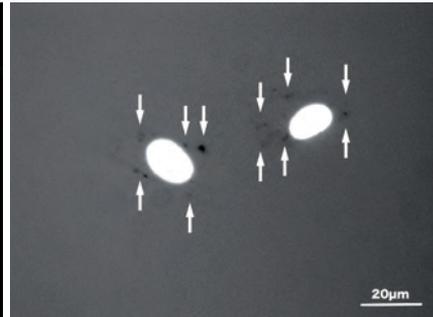


Abb. 57  
Phalloidin Färbung, Phasenkontrast Aufnahme, Hd 7/13 + E (63er Vergrößerung)  
Im Ausschnitt aus Abbildung 56 zeigen sich um die hell dargestellten Zellkernen zahlreiche dunkel abgebildete Eisenpartikel im Bereich des Zytoplasmas (→).  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

## 4 Ergebnisse

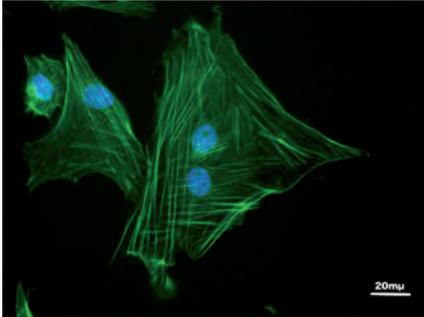


Abb. 58  
Phalloidin Färbung, Hd 4/13 + E (40er Vergrößerung)  
Es zeigen sich mehrere polygonale Stammzellen. Die Zellkerne sind blau markiert, das Zytoskelett stellt sich in Form der Aktinfilamente grün dar. Innerhalb des Zytoplasmas sind keine Eisenpartikel zu erkennen.  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

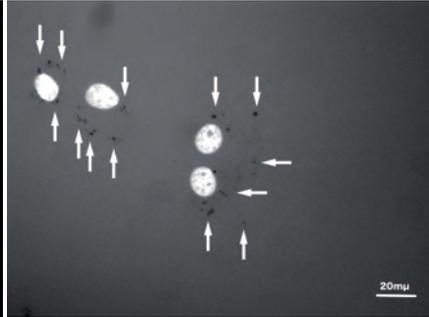


Abb. 59  
Phalloidin Färbung, Phasenkontrast Aufnahme, Hd 4/13 + E (40er Vergrößerung)  
Im Ausschnitt aus Abbildung 58 zeigen sich um die hell dargestellten Zellkernen zahlreiche dunkel abgebildete Eisenpartikel im Bereich des Zytoplasmas (→).  
Hd = Hund; + E = Endorem® markiert; µm = Mikrometer

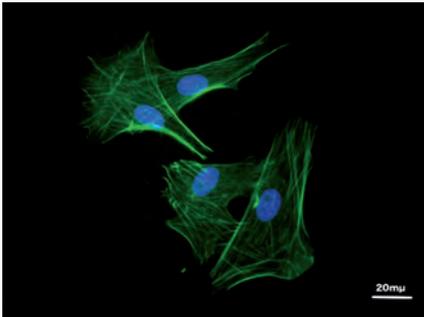


Abb. 60  
Phalloidin Färbung, Hd 4/13 - E (40er Vergrößerung)  
Es zeigen sich vier in Verbindung stehende Stammzellen mit blauen Zellkernen und grünem Zytoskelett (Aktinfilamente)  
Hd = Hund; - E = nicht Endorem® markiert; µm = Mikrometer



Abb. 61  
Phalloidin Färbung, Phasenkontrast Aufnahme, Hd 4/13 - E (40er Vergrößerung)  
Im Ausschnitt aus Abbildung 60 zeigen sich im Bereich der Zellen lediglich hell dargestellte Zellkerne.  
Hd = Hund; - E = nicht Endorem® markiert; µm = Mikrometer

## 4 Ergebnisse

### 4.2.2 MTT Test

Bei der Bewertung der Proliferationskapazität im MTT Test zeigen alle Spenderzellpopulationen eine konstante Zunahme der Absorptionswerte über den Zeitraum Tag 0 bis Tag 3.

Tabellen 8.1 - 8.5 beinhalten die dreifach Messungen für Tag 0, 1, 2, 3 der verschiedenen Zellpopulationen (Hd 4/13, 6/13, 7/13, 11/13 und 16/13) in Endorem<sup>®</sup> markierter (+ E) und unmarkierter (- E) Form (negativ Kontrolle). Des Weiteren wird für jede Zellpopulation ein dreifacher Blankwert (Messung ohne Zellen) aufgeführt.

Der aus den Einzelwerten entstehende arithmetische Mittelwert (Mittelw.) sowie die Standardabweichung (Std. Abw.) befinden sich bis auf eine Ausnahme (Hd 11/13, Tag 2, + E ( $\pm 0,097$ )) im 90 % Erwartungsbereich der mittleren Standardabweichung, getestet mit dem Chi - Quadrat Test. Der genannte Wert wird bei den weiteren Auswertungen als Ausreißer eliminiert.

Tabelle 8 Messwerte MTT Test, Dreifachmessung der Absorption über Tag 0 – 3 mit Ermittlung der arithmetischen Mittelwerte (Mittelw.) und der Standardabweichungen (Std. Abw.) für markierte (+ E) und unmarkierte (- E) Zellpopulationen, sowie dem gemessenen Blank Wert.

Tabelle 8.1: Hd 4/13		Einzelmesswerte			Mittelw.	Std. Abw.
<b>Tag 0</b>	- E	0,478	0,493	0,447	0,473	0,001
<b>Tag 0</b>	+ E	0,234	0,306	0,331	0,290	0,003
<b>Tag 1</b>	- E	1,160	1,094	1,359	1,204	0,019
<b>Tag 1</b>	+ E	0,963	0,966	0,813	0,914	0,008
<b>Tag 2</b>	- E	1,999	1,903	1,919	1,940	0,003
<b>Tag 2</b>	+ E	1,435	1,570	1,465	1,490	0,005
<b>Tag 3</b>	- E	3,191	3,120	3,383	3,231	0,019
<b>Tag 3</b>	+ E	2,379	2,496	2,397	2,424	0,004
	Blank	0,205	0,207	0,183	0,198	0,000

Tabelle 8.2: Hd 6/13		Einzelmesswerte			Mittelw.	Std. Abw.
<b>Tag 0</b>	- E	0,377	0,378	0,395	0,383	0,000
<b>Tag 0</b>	+ E	0,377	0,386	0,416	0,393	0,000
<b>Tag 1</b>	- E	1,136	1,110	1,175	1,140	0,001
<b>Tag 1</b>	+ E	1,131	1,056	1,124	1,104	0,002
<b>Tag 2</b>	- E	1,559	1,416	1,506	1,494	0,005
<b>Tag 2</b>	+ E	1,495	1,468	1,364	1,442	0,005
<b>Tag 3</b>	- E	1,927	1,764	2,097	1,929	0,028
<b>Tag 3</b>	+ E	1,846	1,931	2,004	1,927	0,006
	Blank	0,156	0,157	0,152	0,155	0,000

## 4 Ergebnisse

		Einzelmesswerte			Mittelw.	Std. Abw.
Tag 0	- E	0,346	0,354	0,334	0,345	0,000
Tag 0	+ E	0,327	0,402	0,359	0,363	0,001
Tag 1	- E	0,867	0,812	0,927	0,869	0,003
Tag 1	+ E	0,898	0,783	0,973	0,885	0,009
Tag 2	- E	1,691	1,786	1,806	1,761	0,004
Tag 2	+ E	1,691	1,594	1,488	1,591	0,010
Tag 3	- E	3,234	3,181	3,157	3,191	0,002
Tag 3	+ E	3,005	2,937	2,793	2,912	0,012
	Blank	0,120	0,125	0,128	0,124	0,000

		Einzelmesswerte			Mittelw.	Std. Abw.
Tag 0	- E	0,323	0,29	0,313	0,309	0,000
Tag 0	+ E	0,034	0,034	0,034	0,034	0,000
Tag 1	- E	0,794	0,773	0,789	0,785	0,000
Tag 1	+ E	0,914	0,706	0,774	0,798	0,011
Tag 2	- E	1,656	1,713	1,718	1,696	0,001
Tag 2	+ E	1,406	1,950	1,943	1,766	0,097
		---	1,950	1,943	1,947	0,000
Tag 3	- E	2,692	2,790	2,810	2,764	0,004
Tag 3	+ E	2,665	2,881	2,949	2,832	0,022
	Blank	0,141	0,154	0,143	0,146	0,000

		Einzelmesswerte			Mittelw.	Std. Abw.
Tag 0	- E	0,335	0,339	0,280	0,318	0,001
Tag 0	+ E	0,333	0,354	0,342	0,343	0,000
Tag 1	- E	0,592	0,680	0,623	0,632	0,002
Tag 1	+ E	0,702	0,932	0,880	0,838	0,015
Tag 2	- E	1,009	1,237	1,043	1,096	0,015
Tag 2	+ E	1,225	1,303	1,217	1,248	0,002
Tag 3	- E	1,383	1,422	1,542	1,449	0,007
Tag 3	+ E	1,561	1,364	1,648	1,524	0,021
	Blank	0,142	0,166	0,194	0,167	0,001

Tabelle 9 MTT Test,  $D_1$  Werte der negativ Kontrolle (- E) für alle fünf Zellpopulationen

$D_1$ (Mittelwert - Blank) - E					
	Hd 4/13	Hd 6/13	Hd 7/13	Hd 11/13	Hd 16/13
Tag 0	0,274	0,228	0,220	0,163	0,151
Tag 1	1,006	0,985	0,744	0,639	0,464
Tag 2	1,742	1,339	1,637	1,550	0,929
Tag 3	3,033	1,774	3,066	2,618	1,282

$D_1$  = Delta 1 Wert, ergibt sich aus der Differenz zwischen dem gebildeten Mittelwert der Absorption und dem Mittelwert der Blankmessung für jede Probe; Hd = Hund; - E = negativ Kontrolle (nicht Endorem® markierte Zellen)

## 4 Ergebnisse

Tabelle 10 MTT Test,  $D_1$  Werte der Endorem<sup>®</sup> markierten (+ E) Zellen für alle fünf Zellpopulationen

<b><math>D_1</math> (Mittelwert - Blank) + E</b>					
	<b>Hd 4/13</b>	<b>Hd 6/13</b>	<b>Hd 7/13</b>	<b>Hd 11/13</b>	<b>Hd 16/13</b>
<b>Tag 0</b>	0,092	0,238	0,238	-0,112	0,176
<b>Tag 1</b>	0,716	0,949	0,760	0,652	0,671
<b>Tag 2</b>	1,292	1,287	1,467	1,801	1,081
<b>Tag 3</b>	2,226	1,772	2,787	2,686	1,357

$D_1$  = Delta 1 Wert, ergibt sich aus der Differenz zwischen dem gebildeten Mittelwert der Absorption und dem Mittelwert der Blankmessung für jede Probe; Hd = Hund; + E = positiv Kontrolle (Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen)

Tabelle 11: MTT Test, Steigung  $m$  der Regressionsgraden, Determinationskoeffizient  $r^2$ , sowie die sich ergebendem Delta aus  $m$ ,  $D_m$

(Delta  $m$   $D_m = m_{-E} - m_{+E}$ )

	<b><math>m</math> (- E)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b><math>m</math> (+ E)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b><math>D_m</math></b>
<b>Hd 4/13</b>	0,9012	0,9775	0,6977	0,9869	0,2035
<b>Hd 6/13</b>	0,4991	0,9707	0,4941	0,9790	0,0050
<b>Hd 7/13</b>	0,9430	0,9556	0,8353	0,9539	0,1077
<b>Hd 11/13</b>	0,8276	0,9740	0,9542	0,9947	-0,1266
<b>Hd 16/13</b>	0,3858	0,9847	0,3954	0,9949	-0,0096

$m$  = Steigung der Regressionsgraden;  $r^2$  = Determinationskoeffizient; - E = negativ Kontrolle (nicht Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen); + E = positiv Kontrolle (Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen);  $D_m$  = Delta der Steigungen  $m$  ( $D_m = m_{-E} - m_{+E}$ )

Die dargestellten Regressionsgraden (Abbildungen 62 – 66) ergeben sich aus den Delta  $D_1$  Werten (Tabelle 9 und 10) der gemittelten Absorptionmesswerte und dem mittleren Blankwert im Bezug auf die Zeit. Ihre Steigung, die ein Ausdruck der Proliferationskapazität der Zellen darstellt, ist in Tabelle 11 wiedergegeben. Die Determinationskoeffizienten  $r^2$  befinden sich alle im Bereich  $0,95 > r^2 > 1$  (Tabelle 11).

Die Graphen (Abbildung 62 - 66) zeigen jeweils den Vergleich zwischen Endorem<sup>®</sup> markierten und nicht markierten Zellen einer Spenderpopulation im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte, sowie die durch Regression in erster Näherung gebildeten Interpolationsgeraden.

Anhand der Regressionsgraden und ihrer Steigung  $m$  bei Annahme eines linearen Verlaufes kann die Proliferationskapazität der Zellpopulation interindividuell (Abbildung 62 - 66) ( $\Delta m$   $D_m = m_{-E} - m_{+E}$ ) und interspezifisch (Abbildung 67 - 68)

## 4 Ergebnisse

verglichen werden (Tabelle 11). Unterschiede, die durch Schwankungen der Anfangszellzahl auftreten können, werden durch dieses Verfahren vernachlässigt.

Die Graphen der Zellpopulation Hd 4/13 zeigen als einzige eine eindeutig erkennbar Divergenz der Regressionsgraden. Anhand der Abbildung 62 kann eine stärkere Proliferation der nicht markierten Zellen ( $m_{-E} = 0,9012$ ) gegenüber den markierten Zellen ( $m_{+E} = 0,6977$ ;  $D_m = 0,204$ ) dargestellt werden. Die Proben Hd 7/13 und Hd 11/13 weisen hingegen nur geringste Unterschiede in ihrem Verlauf auf. Hier zeigen sich sowohl minimale Unterschiede in der Steigung zugunsten der markierten, wie unmarkierten Zellpopulation (Hd 7/13  $D_m = 0,108$ ; Hd 11/13  $D_m = -0,109$ ) (Abbildung 64 und 65). Die Regressionsgraden von Hd 6/13 und Hd 16/13 verlaufen annähernd parallel ( $D_m = 0,005$ ;  $D_m = 0,010$ ) (Abbildung 63 und 66).

In der statistischen Analyse kann mit einer Signifikanz von  $p = 0,014$  nachgewiesen werden, dass das Endorem® interindividuell keinen nachweisbar negativen Einfluss auf den Anstieg der Absorptionmesswerte hat (einseitiger Student – t - Test für verbundene Proben).

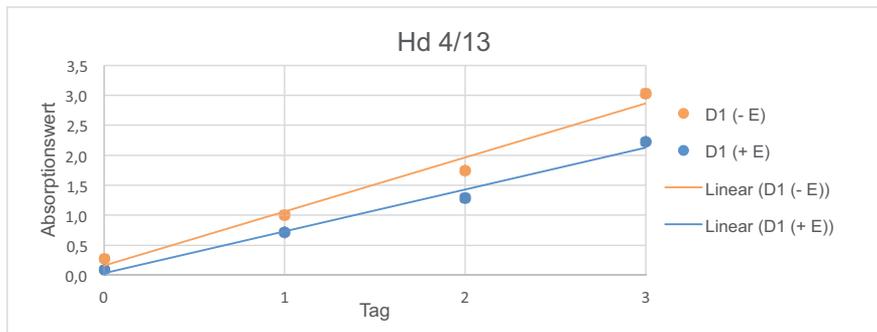


Abb. 62

MTT Test, Zellpopulation Hd 4/13: Die Graphen zeigen die Endorem® markierten (+ E) und nicht markierten (- E) Zellen im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1 \text{ Delta } 1 = \text{Mittelwert} - \text{Blank}$ ), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

## 4 Ergebnisse

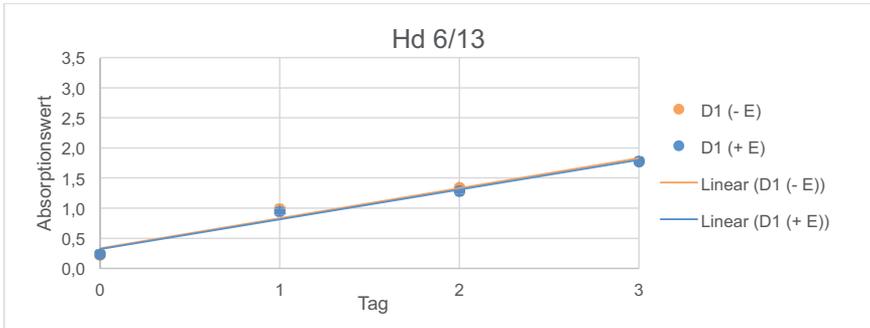


Abb. 63

MTT Test, Zellpopulation Hd 6/13: Die Graphen zeigen die Endorem® markierten (+ E) und nicht markierten (- E) Zellen im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

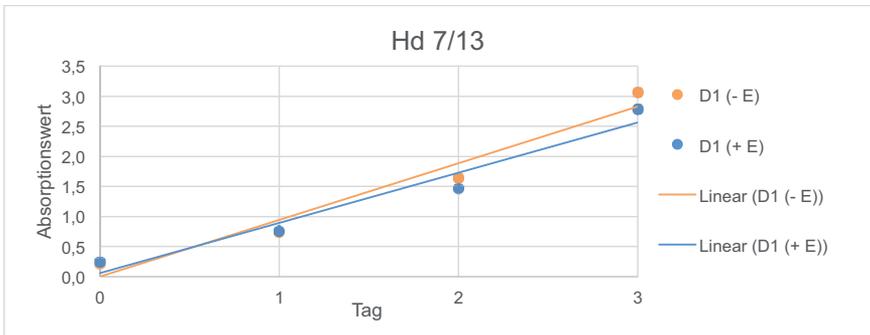


Abb. 64

MTT Test, Zellpopulation Hd 7/13: Die Graphen zeigen den Vergleich zwischen Endorem® markierten (+ E) und nicht markierten (- E) Zellen im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

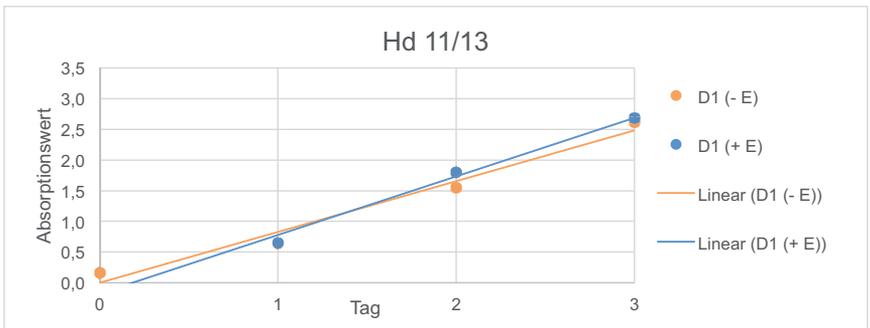


Abb. 65

MTT Test, Zellpopulation Hd 11/13: Die Graphen zeigen den Vergleich zwischen Endorem® markierten (+ E) und nicht markierten (- E) Zellen im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

## 4 Ergebnisse

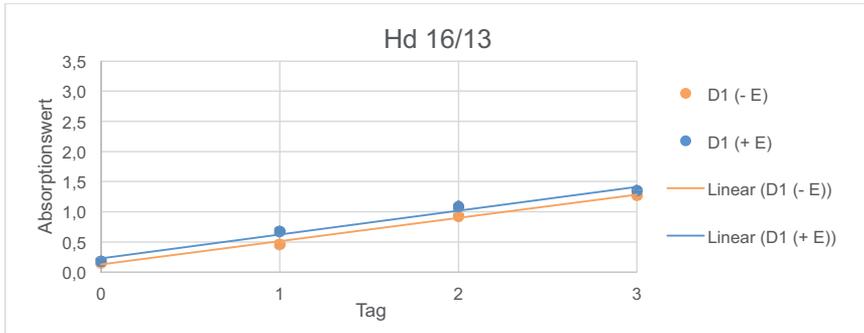


Abb. 66

MTT Test, Zellpopulation Hd 16/13: Die Graphen zeigen den Vergleich zwischen Endorem® markierten (+ E) und nicht markierten (- E) Zellen im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

Alternativ kann bei der statistischen Auswertung der Einzelwerte ( $D_1$ ) zwischen den markierten und unmarkierten Zellpopulationen durch die einseitige Überprüfung der Nullhypothese  $H_0$ , hoch signifikant ( $p = 0,0034$ ) ebenfalls ein negativer Einfluss des Endorems® auf die Zunahme der Absorptionsmesswerte im MTT Test ausgeschlossen werden. Das höhere Signifikanzniveau ergibt sich aus der veränderten Stichprobengröße und der ermittelten Standardabweichung, beinhaltet jedoch das systemische Risiko einer Beeinflussung durch variierende Anfangszellzahlen.

Bei einem interspezifischen Vergleich zeigt die Population von Hd 16/13 - E mit einer Steigung der Regressionsgraden von  $m = 0,3858$  das geringste Wachstumspotenzial, Hd 7/13 - E stellt mit einer Steigung von  $m = 0,943$  den höchsten Wert dar (Tabelle 11). Die Graphen der Abbildungen 67 und 68 zeigen jeweils die 5 Stammzellproben mit und ohne Markierung im Vergleich. Interspezifisch kann anhand der ermittelten Werte und der Regressionsgraden ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Zellpopulationen beobachtet werden. Auf Grund der geringen Probenanzahl ist jedoch kein signifikantes Ergebnis im T - Varianztest für verbundene Proben zu erzielen ( $p = 0,278$ ). Im Pearson Korrelationstest ergibt sich hingegen, dem Bild der Graphen (Abbildungen 67 und 68) entsprechend, eine hohe Korrelation ( $r = 0,87$ ) für den Zusammenhang zwischen den verwendeten Stammzellpopulationen und der zugehöriger Proliferationskapazität  $m$ . Abschließend kann mit dem hoch signifikanten Wert ( $p = 0,0012$ ) gezeigt werden, dass der Einfluss der verschiedenen Zellpopulationen im MTT Test einen stärkeren

## 4 Ergebnisse

Einfluss auf die Absorptionsmesswerte und somit die Proliferationskapazität hat als die Markierung mit Endorem®.

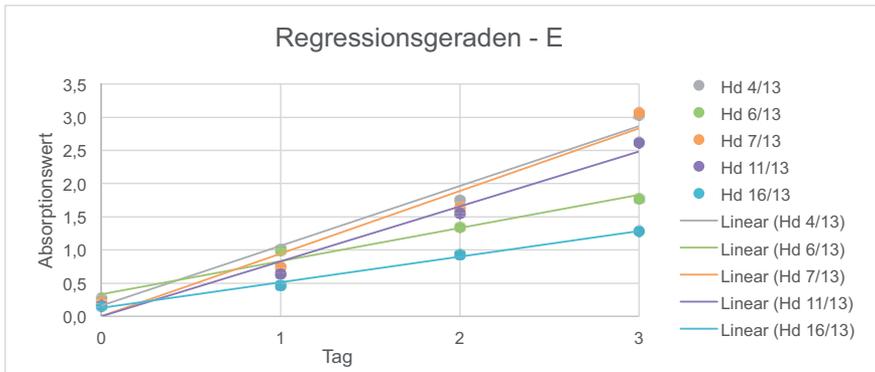


Abb. 67

MTT Test, interspezifischer Vergleich der Absorptionsmesswerte der negativ Kontrolle (- E) aller fünf Zellpopulationen. Dargestellt sind die  $D_1$  - Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die daraus gebildeten linearen Regressionsgeraden über die Zeit.

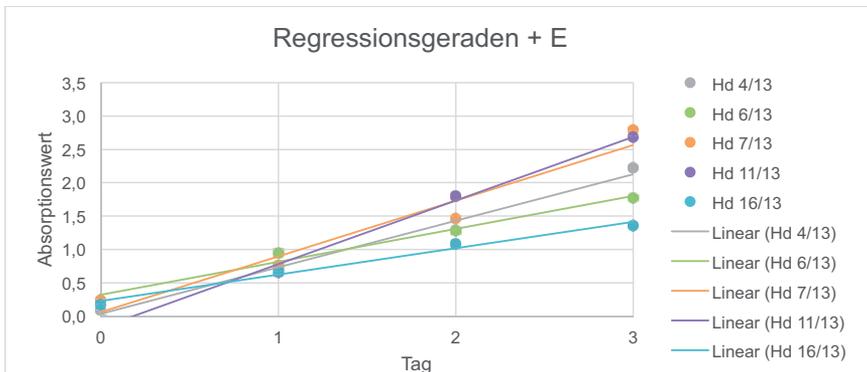


Abb. 68

MTT Test, interspezifischer Vergleich der Absorptionsmesswerte der mit Endorem® markierten Zellen (+ E) aller fünf Zellpopulaion. Dargestellt sind die  $D_1$  - Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die daraus gebildeten linearen Regressionsgeraden über die Zeit.

## 4 Ergebnisse

### 4.2.3 Life Cell Imaging

Zur Einschätzung der Migrationskapazität Endorem<sup>®</sup> markierter (+ E) im Vergleich zu unmarkierter (- E) Stammzellen werden die nativ Aufnahmen aus dem Life Cell Imaging mittels Flächenberechnung (*ImageJ*) ausgewertet. Tabelle 12 zeigt die sich aus den dreifach gemessenen Werten (9.2.1.1/2 Anhang, gemessene Einzelwerte und Standardabweichung) ergebenden arithmetischen Mittelwerte der nicht von der Zellkultur bedeckten Fläche im zeitlichen Verlauf (Messung alle 3 h) über insgesamt 24 h. Werte von 0 in<sup>2</sup> bedeuten, dass die Zellkultur die komplette Fläche besiedelt hat und zu diesem Zeitpunkt keine freie Fläche mehr vorhanden ist.

Tabelle 12 Life Cell Imaging, Flächenberechnung der Freifläche und daraus gebildeten Mittelwerte über die Zeit für alle Zelllinien mit (+ E) und ohne (- E) Endorem<sup>®</sup> - Markierung

(Alle Mittelwerte in in<sup>2</sup> bei einer dargestellten gesamt Bildfläche von 63,964 in<sup>2</sup>)

Zeit in h	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Hd 4/13 + E	32,554	30,088	24,906	16,996	9,899	3,727	1,262	0,000	0,000
Hd 4/13 - E	30,989	28,500	23,047	17,582	11,728	7,972	2,936	0,733	0,000
Hd 6/13 + E	30,651	29,758	26,544	21,298	15,642	10,130	6,814	5,066	1,800
Hd 6/13 - E	32,194	30,493	25,773	21,360	16,949	10,806	7,252	4,656	3,835
Hd 7/13 + E	32,317	30,300	23,127	18,453	14,645	9,856	4,454	2,157	0,000
Hd 7/13 - E	33,609	32,642	29,136	23,649	19,730	14,168	10,912	5,519	3,412
Hd 11/13 + E	28,885	26,753	20,349	14,289	5,017	2,677	0,821	0,000	0,000
Hd 11/13 - E	28,165	26,700	21,805	17,735	12,244	4,983	1,639	1,182	0,000
Hd 16/13 + E	26,129	22,938	16,969	8,788	1,862	0,000	0,000	0,000	0,000
Hd 16/13 - E	31,872	28,269	22,621	14,219	8,522	3,479	0,000	0,000	0,000

h = Stunden; Hd = Hund (Zellkultur); + E = Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen; - E = negativ Kontrolle; in = Inch

Der Bereich der linearen Wachstumsphase wird im Life Cell Imaging bei der Auswertung als charakteristisch für das Potenzial der Zellen angesehen. Anhand der errechneten Mittelwerte wird eine Regressionsgerade speziell für diesen Bereich erstellt. Mit Hilfe der Geraden kann eine vom Anfangswert (freie Fläche bei Beginn des Versuches) unabhängige Analyse der Geschwindigkeiten vorgenommen werden. Die Steigung  $m$  der gebildeten Geraden ( $y = m \cdot x + b$ ) ermöglicht einen direkten Vergleich der Migrations- und Proliferationskapazität der Zellen untereinander. Die Determinationskoeffizienten  $r^2$  befinden sich im vorgegebenen Bereich von  $0,95 > r^2 > 1$  für eine sehr gute Approximation der gemessenen Werte (Tabelle 13). Die berechneten Delta Werte  $D_m$  ( $D_m = m_{-E} - m_{+E}$ ) der Proben geben Auskunft über

## 4 Ergebnisse

Abweichungen zwischen den Endorem<sup>®</sup> markierten (+ E) und unmarkierten Zellen (- E) (Tabelle 13).

Die Abbildungen 69 bis 73 zeigen jeweils die Regressionsgeraden der Proben mit (+ E) und ohne Endorem<sup>®</sup> (- E) Markierung im Vergleich. Bei allen Proben verlaufen die Regressionsgeraden annähernd parallel und zeigen lediglich geringe Abweichung ( $D_m < 0,35$ ) in ihrer Steigung  $m$ . Bei dem Test der Deltadaten  $D_m$  auf die Nullhypothese  $H_0$  ergibt sich, dass die Markierung mit Endorem<sup>®</sup> einer Zellpopulation signifikant ( $p = 0,023$ ) keinen negativen Einfluss auf die Besiedlungsgeschwindigkeit der Freifläche hat.

Tabelle 13: Life Cell Imaging, Steigung  $m$  der Regressionsgeraden, Determinationskoeffizient  $r^2$ , sowie die sich ergebenden Delta aus  $m$ ,  $D_m$

(Delta  $m$   $D_m = m_{-E} - m_{+E}$ )

Probe	-m (+E)	$r^2$	-m (-E)	$r^2$	$D_m$
Hd 4/13	2,0454	0,9835	1,7038	0,9966	0,3416
Hd 6/13	1,3971	0,9789	1,4894	0,9922	0,0923
Hd 7/13	1,5521	0,9883	1,5154	0,9971	0,0367
Hd 11/13	1,8281	0,9526	1,7665	0,9879	0,0616
Hd 16/13	2,3803	0,9968	2,1227	0,9925	0,2576
			<i>Mittelw.</i>		<i>-0,0953</i>
			<i>Std. Abw.</i>		<i>0,1819</i>

Hd = Hund; m = Steigung;  $r^2$  = Determinationskoeffizient; + E = Endorem<sup>®</sup> markiert; - E = nicht Endorem<sup>®</sup> markiert;  $D_m$  = Delta der Steigung  $m$ , Mittelw. = Mittelwert; Std. Abw. = Standardabweichung

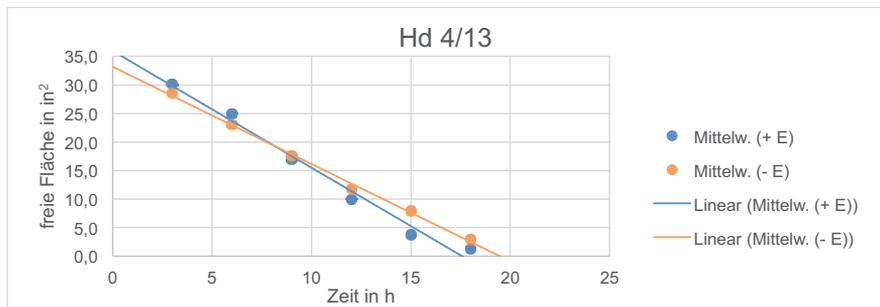


Abb. 69

Life Cell Imaging Hd 4/13, aus den Mittelwerten (Mittelw.) der linearen Wachstumsphase gebildete Regressionsgeraden. Dargestellt werden Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen (+ E) im Vergleich zur negativ Kontrolle (- E) über 24 Stunden (h). Fläche in  $\text{in}^2 = \text{Inch}^2$

## 4 Ergebnisse

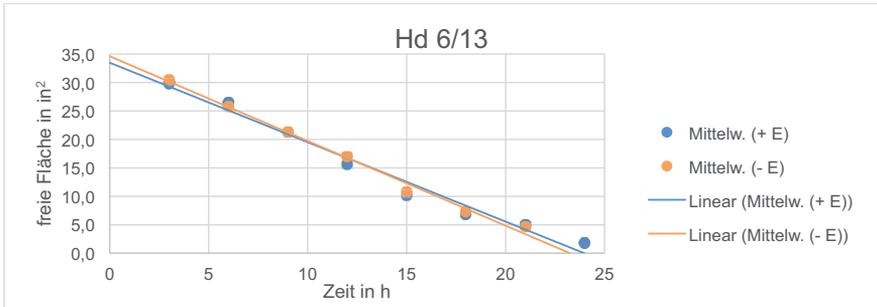


Abb. 70

Life Cell Imaging Hd 6/13, aus den Mittelwerten (Mittelw.) der linearen Wachstumsphase gebildete Regressionsgeraden. Dargestellt werden Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen (+ E) im Vergleich zur negativ Kontrolle (- E) über 24 Stunden (h). Fläche in  $\text{in}^2 = \text{Inch}^2$

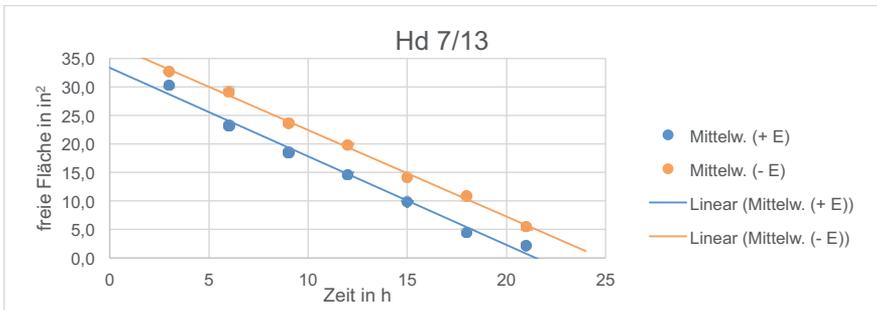


Abb. 71

Life Cell Imaging Hd 7/13, aus den Mittelwerten (Mittelw.) der linearen Wachstumsphase gebildete Regressionsgeraden. Dargestellt werden Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen (+ E) im Vergleich zur negativ Kontrolle (- E) über 24 Stunden (h). Fläche in  $\text{in}^2 = \text{Inch}^2$

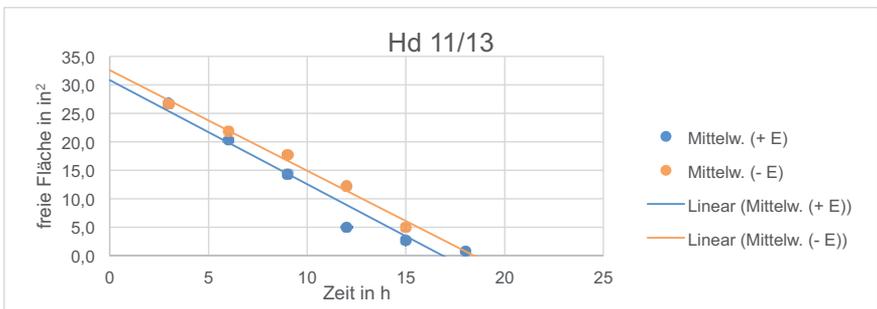


Abb. 72

Life Cell Imaging Hd 11/13, aus den Mittelwerten (Mittelw.) der linearen Wachstumsphase gebildete Regressionsgeraden. Dargestellt werden Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen (+ E) im Vergleich zur negativ Kontrolle (- E) über 24 Stunden (h). Fläche in  $\text{in}^2 = \text{Inch}^2$

## 4 Ergebnisse

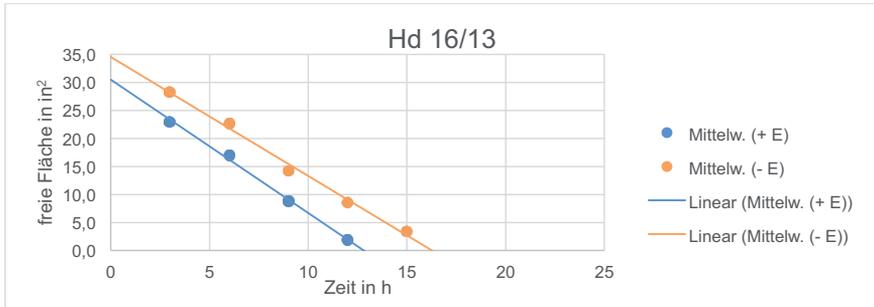


Abb. 73

Life Cell Imaging Hd 16/13, aus den Mittelwerten (Mittelw.) der linearen Wachstumsphase gebildete Regressionsgeraden. Dargestellt werden Endorem<sup>®</sup> markierte Zellen (+ E) im Vergleich zur negativ Kontrolle (- E) über 24 Stunden (h). Fläche in in<sup>2</sup> = Inch<sup>2</sup>

Anhand der Daten aus Tabelle 12 ist deutlich zu erkennen, dass der Ausgangswert der unbesiedelten Fläche zum Zeitpunkt 0 h bei den Proben trotz standardisierter freier Fläche im Culture - Insert innerhalb der Proben variiert. Zur besseren visuellen interspezifischen Vergleichbarkeit werden die Daten daher normiert und die freie Fläche in Prozent der Ausgangsfläche angegeben (Anhang 9.2.1.3 normalisierte Werte in Prozent).

Die Abbildungen 74 und 75 beschreiben die Wachstumskurven der fünf Zellpopulationen (Hd 4/13, Hd 6/13, Hd 7/13, Hd 11/13, Hd 16/13) mit (+ E) und ohne Endorem<sup>®</sup> (- E) Markierung zur Fläche in Prozent. Sowohl in den negativ Kontrollen (- E) als auch bei den Endorem<sup>®</sup> markierten (+ E) Zellen sind Abweichung in der Migrations- und Proliferationsgeschwindigkeit zwischen den Zelllinien erkennbar. Während die Zelllinie Hd 16/13 + E mit einer Besiedlungszeit von nur ca. 15 h das schnellste Wachstum aufweist, liegt bei drei der zehn Zellpopulationen, Hd 6/13 – E und + E und Hd 7/13 – E, nach 24 h eine inkomplette Besiedlung der freien Fläche vor. Im Mittel (unter Einbeziehung aller Proben + E und - E) ist 50 % der freien Fläche nach  $10,4 \text{ h} \pm 1,9 \text{ h}$  bewachsen (Anhang 9.2.1.4). Die Endorem<sup>®</sup> markierten Zellen (+ E) weisen einen durchschnittliche 50 % Besiedlungszeit von  $9,7 \text{ h} \pm 1,6 \text{ h}$  auf. Die negativ Kontrolle (- E) ist im Mittel nach  $11,1 \text{ h} \pm 1,8 \text{ h}$  zu 50 % bewachsen. Nach durchschnittlich  $21,0 \text{ h} \pm 3,2 \text{ h}$  (unter Ausschluss der drei inkomplett bewachsenen Proben, 2 x (- E), 1 x (+ E)) kann bei 7 von 10 Proben (+ E und - E) eine vollständige Besiedlung der freien Fläche beobachtet werden. Die Endorem<sup>®</sup> markierten Zellen weisen hier einen Mittelwert von  $20,3 \text{ h} \pm 3,3 \text{ h}$  auf. Die nicht markierten Zellen benötigen im Durchschnitt  $22,0 \text{ h} \pm 2,8 \text{ h}$  für eine vollständige

## 4 Ergebnisse

Ausbreitung (Anhang 9.2.1.5). Bei allen Populationen ist der typische Kurvenverlauf in Form von Lag Phase, linearer Wachstumsphase und Sättigungsphase nachvollziehbar (Abbildung 74 und 75).

Ein Zusammenhang zwischen den Messergebnissen und den verschiedenen Zelllinien lässt sich auch im Life Cell Imaging mit dem T - Varianztest nur tendenziell nachweisen ( $p = 0,099$ ). Somit besteht mit einer Wahrscheinlichkeit von 90,1 % ein Zusammenhang zwischen dem gemessenen Absorptionwert und der verwendeten Stammzelllinie. Diese sehr hohe Abhängigkeit von Migrations - und Proliferationskapazität von der jeweiligen Zelllinie kann bei einer, wie hier vorliegenden geringen Probenanzahl, mit einem Wert von 0,94 im Pearson Korrelationstest eindeutig belegt werden.

Im einseitig verbundenen T - Test kann hoch signifikant gezeigt werden ( $p = 0,0008$ ), dass die verwendete Stammzelllinie im Vergleich zu der Markierung der Zellen mit Endorem® einen höheren Einfluss auf das Verhalten im Life Cell Imaging hat.

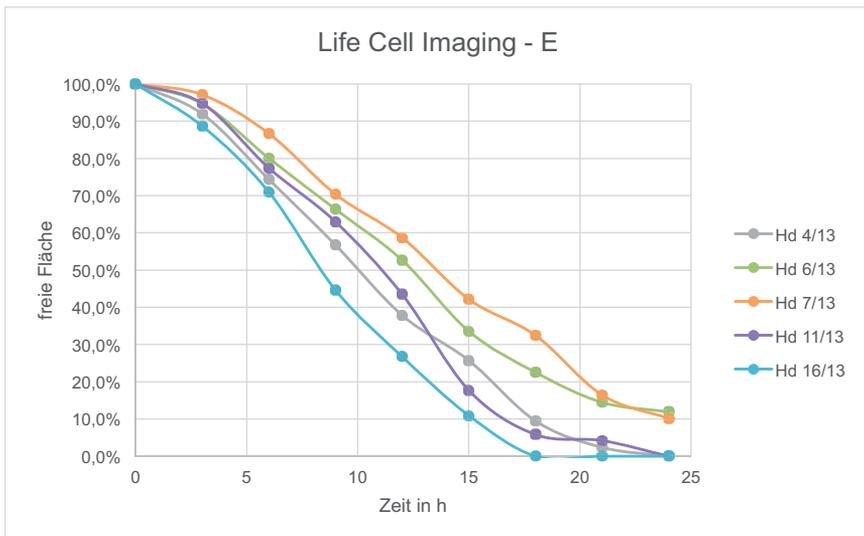


Abb. 74

Wachstumskurve des Life Cell Imaging im zeitlichen Verlauf über 24 Stunden (h), negativ Kontrolle (- E). Darstellung der Daten (freie Fläche) auf der y - Achse zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent der Fläche zum Zeitpunkt Null.

## 4 Ergebnisse

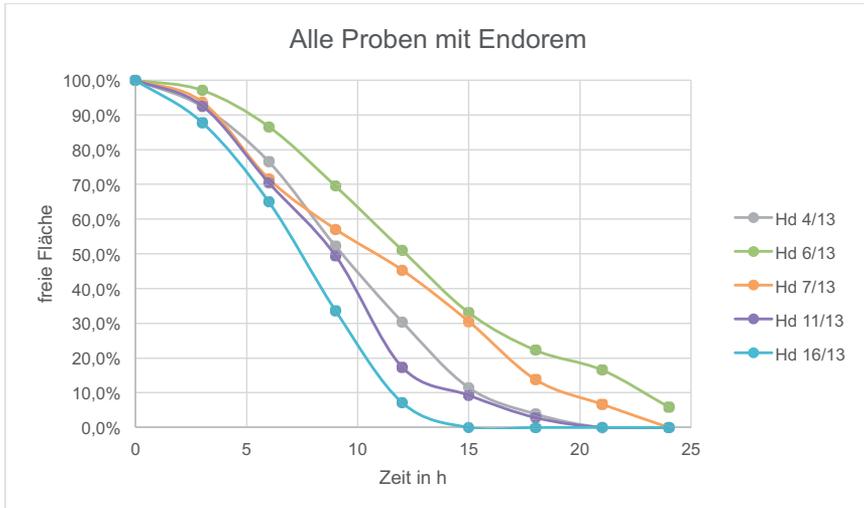


Abb. 75  
Wachstumskurve des Life Cell Imaging im zeitlichen Verlauf über 24 h, Endorem® markierte Zellen (+ E). Darstellung der Daten (freie Fläche) auf der y - Achse zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent der Ausgangsfläche.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sowohl in den Messergebnissen des MTT Testes als auch im Life Cell Imaging ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien beobachtet und analysiert werden konnte, werden die erhobenen Daten der zwei Tests auf Korrelation geprüft. Mit dem Pearson Korrelationstest kann kein Zusammenhang zwischen den Proben in den verschiedenen Tests belegt werden. Stammzellpopulationen, die im Life Cell Imaging eine besonders schnelle Besiedlungszeit zeigen, wie zum Beispiel Hd 16/13 ( $-m_{(+E)} = 2,3803$ ;  $-m_{(-E)} = 2,1227$ ), schneiden im MTT Test ( $m_{(+E)} = 0,3954$ ;  $m_{(-E)} = 0,3858$ ) deutlich schlechter ab. Bei der Probe Hd 7/13 beispielsweise verhält es sich entgegen gesetzt, diese erbringt eine starke Zunahme der Absorptionswerte im MTT ( $m_{(+E)} = 0,8353$ ;  $m_{(-E)} = 0,9430$ ), zeigt jedoch eine eher langsame Besiedlungszeit im Life Cell Imaging ( $-m_{(+E)} = 1,5521$ ;  $-m_{(-E)} = 1,5154$ ). Hd 6/13 erbringt in beiden Tests eher schwache Werte, zeigt somit eine geringe Zunahme der Absorptionswerte im MTT Test ( $m_{(+E)} = 0,4942$ ;  $m_{(-E)} = 0,4991$ ) und langsame Besiedlungszeiten im Life Cell Imaging ( $-m_{(+E)} = 1,3971$ ;  $-m_{(-E)} = 1,4894$ ). Die Populationen von Hd 11/13 und Hd 4/13 erbringen hohe Absorptionswerte im MTT Test (Hd 11/13:  $m_{(+E)} = 0,9542$ ;  $m_{(-E)} = 0,8276$ ; Hd 4/13:  $m_{(+E)} = 0,6977$ ;  $m_{(-E)} = 0,9012$ ) und mittlere bis schnelle Besiedlungszeiten in der Auswertung des Life Cell Imaging (Hd 11/13:  $-m_{(+E)} =$

#### 4 Ergebnisse

1,8281;  $-m_{(-E)} = 1,7665$ ; Hd 4/13:  $-m_{(+E)} = 2,0454$ ;  $-m_{(-E)} = 1,7038$ ) (siehe Anhang 9.2.2  
Vergleich Life Cell Imaging mit MTT Test).

## 4 Ergebnisse

### 4.3 Elektronenmikroskopie

Eine Untersuchung der Zellen auf ultrastruktureller Ebene mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskopes (TEM) zeigt die verschiedenen Formen der Einlagerung des Eisenoxides Endorem<sup>®</sup> in das Zytoplasma. Sowohl in den Endorem<sup>®</sup> markierten als auch den unmarkierten Zellen sind zahlreiche elektronendichte Bestandteile im Zytoplasma als auch in den Zellorganellen nachzuvollziehen (Abbildung 76, 78 und 79). Hierbei handelt es sich neben den Endorem<sup>®</sup> - Partikeln ebenfalls um physiologisch vorkommende Einlagerungen in der Zelle. Diese sich dunkel grau darstellenden Bestandteile können jedoch bei hoher Vergrößerung eindeutig auf Grund ihrer abgerundeten homogenen Morphologie von den körnig und inhomogen wirkenden tief schwarzen Endorem<sup>®</sup> - Partikeln unterschieden werden (Abbildung 77 und 79). Bei allen 5 markierten Präparaten kann eine überwiegend freie Ansammlung der Eisenoxidpartikel im Bereich des Zytoplasmas nachgewiesen werden. Die körnigen Partikel kumulieren in diesem Bereich in unregelmäßiger Form und liegen ohne sichtbare umgebende Membran im Plasma vor (Abbildungen 77, 80, 81, 85, 86, 87, 89). In allen fünf Proben finden sich auch in geringer Anzahl Ansammlungen von Eisenoxidpartikeln in den Lysosomen (Abbildungen 82, 83, 88). Sowohl die freien Cluster als auch die mit Endorem<sup>®</sup> gefüllten Lysosomen kommen Zellkern nah, sowie in der Peripherie der Zellen vor. In seltenen Fällen kann das Endorem<sup>®</sup> ebenfalls in den sogenannten Residualkörperchen nachgewiesen werden (Abbildung 90). Nicht kumulierte, vereinzelt Endorem<sup>®</sup> - Partikel, die frei im Zytoplasma liegen, können mit dem Elektronenmikroskop nicht eindeutig gegenüber der negativ Kontrolle unterschieden werden.

## 4 Ergebnisse

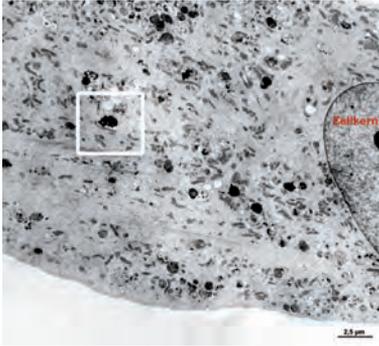


Abb. 76  
TEM Hd 4/13 + E, Zellabschnitt mit Zellkern und zahlreichen dunklen Endorem®-Einlagerungen im Zytoplasma

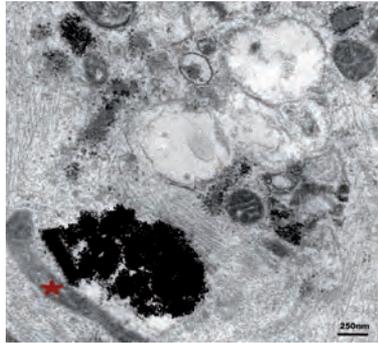


Abb. 77  
TEM Hd 4 /13 + E, Vergrößerung aus der Abb. 76, zu sehen ist eine inhomogene körnige tief schwarze Ansammlung von Endorem®-Partikeln frei im Zytoplasma der Zelle.

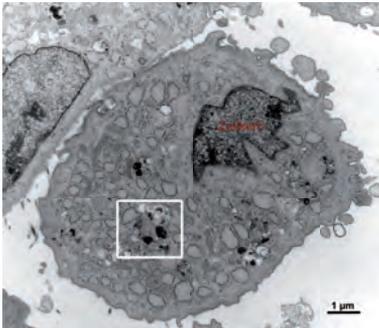


Abb. 78  
TEM Hd 4 /13 - E, elektronendichte Einlagerungen im Zytoplasma der negativ Kontrolle

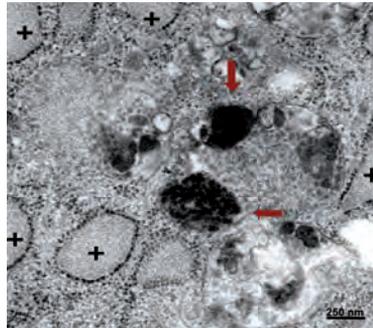


Abb. 79  
TEM Hd 4/13 - E, Vergrößerung der Abb. 78, zwischen den Lysosomen (+) zeigen sich homogene rundliche elektronendichte Einlagerungen, die jedoch auf Grund ihrer Morphologie von Endorem® Partikeln zu unterscheiden sind. Diese Einlagerungen stellen sich im Vergleich zu den Endorem® - Partikeln weniger körnig, kontrastärmer und undeutlicher begrenzt dar.

## 4 Ergebnisse

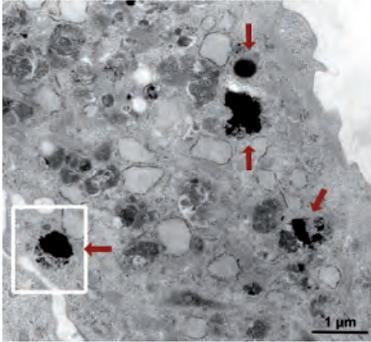


Abb. 80  
TEM Hd 4/13 + E, zu sehen sind frei im Zytoplasma befindliche Endorem® - Cluster (→)

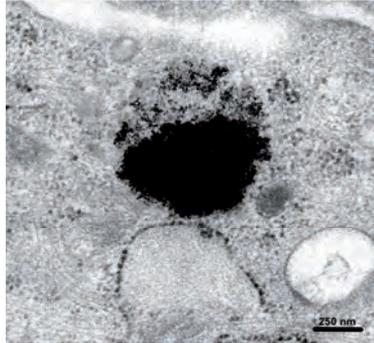


Abb. 81  
TEM Hd 4/13 + E, Vergrößerung der Abb. 80, elektronendichtes im Zytoplasma der Zelle befindliches körniges Endorem® - Cluster ohne erkennbare umgebende Membran

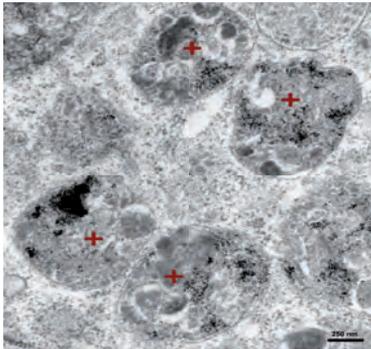


Abb. 82  
TEM Hd 6/13 + E, im Zytoplasma befindliche Lysosomen (+), in denen eindeutige körnige, tief schwarze Endorem® - Partikel nach zu vollziehen sind

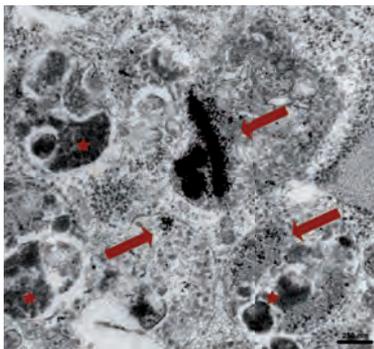


Abb. 83  
TEM Hd 6/13 + E, es zeigen sich sowohl in Clustern kumulierte körnige Endorem® Partikel als auch geringe Ansammlungen in den Lysosomen (→). Daneben finden sich Lysosomen mit elektronendichtem Inhalt (★), der sich jedoch von seiner Morphologie von den Endorem® - Partikeln unterscheidet. Dieser Inhalt erscheint deutlich weniger körnig und insgesamt homogener in seiner Struktur.

## 4 Ergebnisse

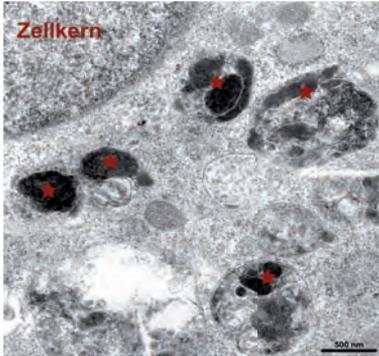


Abb. 84  
TEM Hd 7/13 - E, elektronendichter homogener Inhalt in einer unmarkierten Zelle (★)

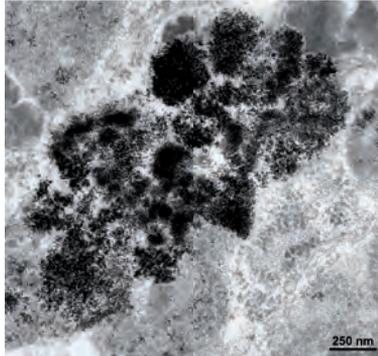


Abb. 85  
TEM Hd 7/13 + E, frei im Zytoplasma vorliegende Cluster von elektronendichten körnigen Endorem® - Partikeln



Abb. 86  
TEM Hd 11/13 + E, Querschnitt einer Zelle mit Zellkern, im Außenbereich zeigen sich strangförmige Cluster von Endorem® - Partikeln (→)

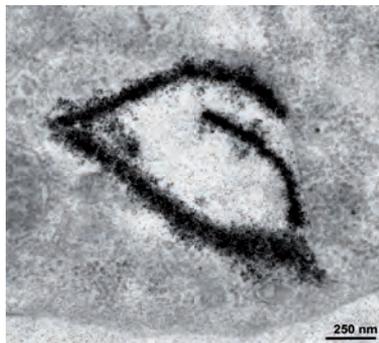


Abb. 87  
TEM Hd 11/13 + E, strangförmiges körniges Endorem® - Cluster im Zytoplasma

## 4 Ergebnisse

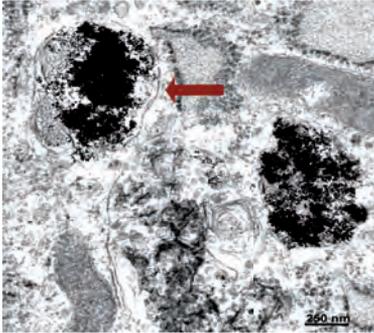


Abb. 88  
TEM Hd 11/13 + E, Endorem® - Partikel innerhalb eines Lysosoms mit deutlich erkennbarer Membran (→). Die Endorem® - Partikel wirken körnig, kontrastreich und tief schwarz.

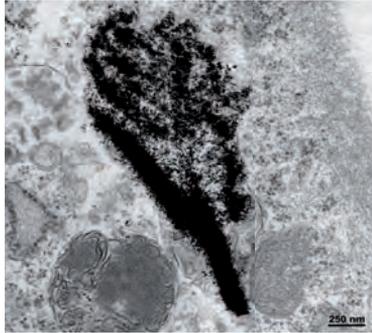


Abb. 89  
TEM Hd 11/13 + E, amorphes, nicht Kompartiment - gebundenes körniges Endorem® - Cluster im Zytoplasma

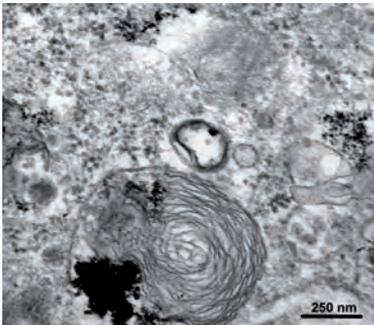


Abb. 90  
TEM Hd 16/13 + E, tief schwarze Endorem® - Partikel innerhalb eines Residualkörpers

### 4.4 MRT Messung

#### 4.4.1 Defektlokalisierung, Defektgröße

Die Auswertung der MRT Daten zeigt bei allen Knien einen annähernd vergleichbaren, zylindrischen Defekt im lateralen Femurkondylus. Bei der Auswertung der Defektlokalisierung im Sagittalschnitt kann bei einem Mittelwert von  $1,92 \pm 0,16$  festgestellt werden, dass sich alle Defekte im mittleren Drittel ( $1 < X < 3$ ) des Femurkopfes befinden. Die Ausmessung der dorsal orientieren Schnitte ergab einen Mittelwert von  $1,39 \pm 0,26$ , Dies entspricht einer durchschnittlich zentro - medialen Lokalisation des Defektes im Bereich des lateralen Femurkondylus (Anhang 9.2.3.1).

Die Ausmessung der Defektgrößen ergibt in der transversal orientierten T2 WATS einen Wert von  $0,305 \text{ cm}^2 \pm 0,084 \text{ cm}^2$  und in der dorsalen T2 TSE einen Mittelwert von  $0,137 \text{ cm}^2 \pm 0,027 \text{ cm}^2$ . Die sagittale T1 gewichteten Aufnahmen ergaben einen Wert von  $0,146 \text{ cm}^2 \pm 0,037 \text{ cm}^2$ , der geringfügig über den Werten der T2\* FFE 2 mm und 3 mm Schichtdicke lag (T2\* FFE 2 mm:  $0,135 \text{ cm}^2 \pm 0,027 \text{ cm}^2$ , T2\* FFE 3 mm:  $0,139 \text{ cm}^2 \pm 0,035 \text{ cm}^2$ ) (Anhang 9.2.3.4).

Während die seitlichen Abgrenzungen des Defektes bei allen Präparaten als klare Kanten ersichtlich sind, kommt es bei elf von zwanzig Knien (Knien Nr. 4, 9, 10, 13, 15, 16, 19, 20, 21, 23, 24) am Boden der Bohrung in der T2\* - orientieren Wichtung zu einem deutlichen Signalverlust im Bereich des Knochens. Beobachtet wird hier eine diffuse Verteilung im Nahbereich des Defektes, die teilweise in der Auswertung eine Abgrenzung gegenüber dem Knochen nach proximal erschwert (Abbildung 91 und 95). In der Protonendichte gewichteten Sequenz kann dies nicht beobachtet werden (Abbildung 92). Des Weiteren können in 11 von 20 Knien eindeutige, kleine, echoarme, kreisrunde Areale innerhalb des Gelimplantates in den verschiedenen Orientierungen und Wichtungen festgestellt werden (Abbildungen 93 u 94), bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Luftschlüsse handelt. Die übrigen 9 Knie zeigen sich in der Untersuchung frei von eindeutig identifizierbaren eingeschlossenen Luftblasen (Anhang 9.2.3.1). Jedoch fällt auch innerhalb dieser Gruppe bei einzelnen Präparaten eine deutliche Inhomogenität innerhalb des Gelbereiches auf, welche ebenfalls ein Anzeichen für Gaseinschlüsse darstellen kann. Bei der Betrachtung der sagittal und dorsal orientieren Schnitte zeigt sich in den meisten Fällen eine vollständige Füllung des Defektes durch das Gelimplantat. Die Signalintensität des Implantates unterscheidet sich hier deutlich von der des

## 4 Ergebnisse

umgebenen Knochens und des interartikulären Raumes. Lediglich bei Knie 11 und 23 fällt eine nicht vollständige, schräge Füllung des Defektes auf (Abbildung 95).



Abb. 91  
MRT, Knie 19, T2\* 3D FFE sagittal Schnitt mit deutlichem Signalverlust im proximalen Bereich oberhalb des Defektes (→).



Abb. 92  
MRT, Knie 19, PDW sagittal Schnitt, klar begrenzter Defekt im Femurkondylus zu erkennen.

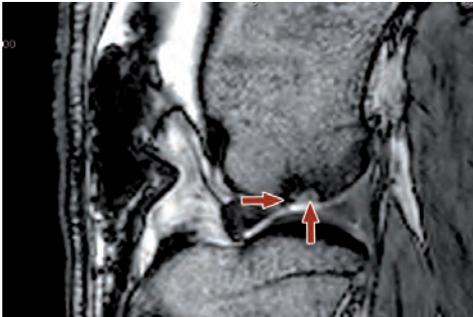


Abb. 93  
MRT, Knie 22 T2\* 3D FFE sagittal Schnitt. Innerhalb des Defektes sind deutliche kreisrunde Luftblasen (→) erkennbar.

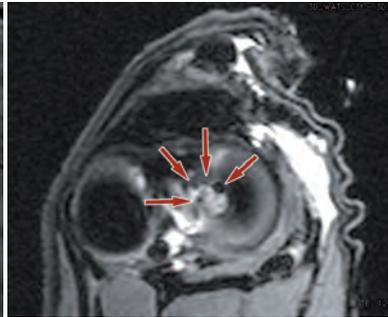


Abb. 94  
MRT, Knie 22, transversale 3D WATS Aufnahme. Es zeigen sich deutliche runde Luftblasen im Implantat Bereich (→).

## 4 Ergebnisse

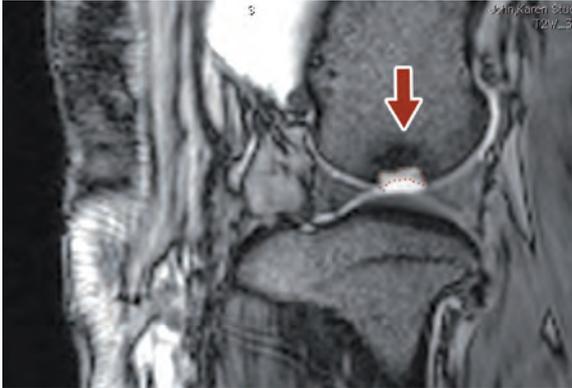


Abb. 95

MRT, Knie 23, T2\* 3D FFE gewichteter sagittal Schnitt. Dargestellt ist eine inkomplette Füllung des Defektes durch das Implantat (umrandeter Bereich) sowie eine Signalabschwächung im proximalen Bereich über dem artifiziellen Defekt (→).

### 4.4.2 Objektive Auswertung

In der objektiven Auswertung werden die Regions of Interest (ROIs) jeweils so platziert, dass diese den gesamten Defekt ausfüllen. Die Auswertung der gemessenen und normierten Daten zeigt eine sehr starke Streuung der Signalintensitäten (Tabelle 14).

Abbildung 96 und 97 verdeutlichen die hohen Standardabweichungen der gemessenen Werte für alle Konzentrationen. Das Gel allein erreicht, ohne das Hinzufügen von Zellen, einen Mittelwert von  $65,33 \pm 17,87$ . Bei der geringsten Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro ml ergibt sich ein Mittelwert von  $46,83 \pm 31,05$ . Der Mittelwert der Konzentration  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml Gel weicht jedoch mit  $67,13 \pm 34,02$  stark von dem Modell der Signalabschwächung durch das Eisenoxid ab. Speziell hier kommt es zu einer massiven Streuung der Daten und der daraus hervorgehend sehr hohen Standardabweichung. Der Mittelwert der Präparate mit  $10 \times 10^5$  Zellen pro ml Gel ist mit  $51,97 \pm 22,88$  niedriger als der erste und dritte Wert, und liegt oberhalb der zweiten Werte (siehe auch Anhang 9.2.3.2).

In der statistischen Varianzanalyse mittels zweiseitigem Student - t Test (Welch - Test für ungleiche Varianzen) ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den normierten Mittelwerten und der Zellkonzentration im Gel.

## 4 Ergebnisse

Auch im Pearson Korrelationstest kann keine Abhängigkeit der Daten nachgewiesen werden (Anhang 9.2.3.3).

Tabelle 14 MRT, objektive Messung, Mittelwerte der normierten Daten mit Standardabweichungen für die Signalintensitäten der T2\* FFE (2 mm Schichtdicke)

Konzentration $\times 10^5$	Mittelw. T2* (2 mm) normiert	Std. Abw. T2* (2 mm) normiert
0,00	65,33	17,87
0,50	46,83	31,05
4,75	67,13	34,02
10,00	51,97	22,88

Mittelw. = Mittelwert; Std. Abw. = Standardabweichung; mm = Millimeter

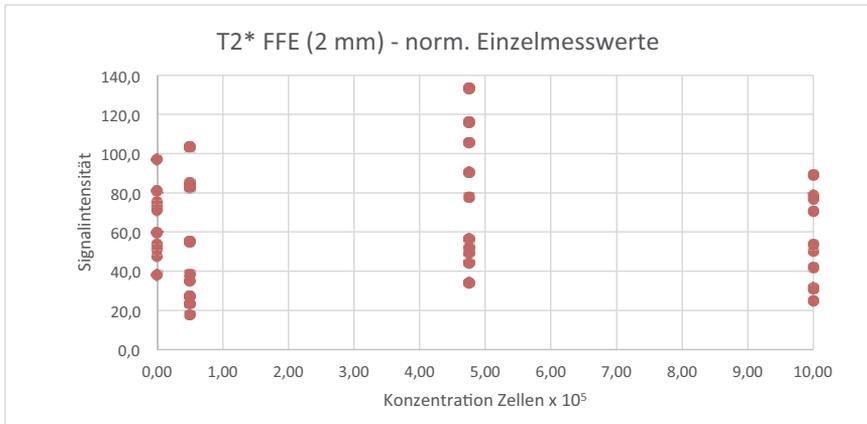


Abb. 96

MRT, objektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der normierten Einzelmesswerte in der T2\* - gewichteten Sequenz (2 mm Schichtdicke).

## 4 Ergebnisse

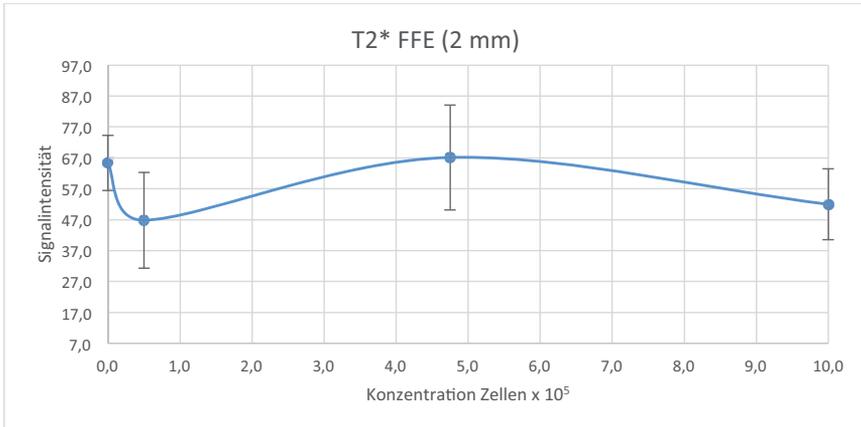


Abb. 97

MRT, objektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der gebildeten Mittelwerte für die verwendeten Zellmengen in der T2\* – gewichteten Sequenz (2 mm Schichtdicke). Bei allen Zellkonzentrationen zeigen die Daten eine hohe Standard Abweichung.

Die Analyse der Messergebnisse aus den verschiedenen MRT Sequenzen zeigt in der objektiven Defektmessung klare Unterschiede in den Signalintensitäten auf. Ein graphischer oder statistischer Zusammenhang mit der steigenden Endorem<sup>®</sup> Konzentration im Defekt ist jedoch auch hier nicht nachweisbar (siehe Anhang 9.2.3.2 – 9.2.3.4).

### 4.4.3 Subjektive Auswertung

In der subjektiven Auswertung wird die ROI vom Untersucher so platziert, dass nach Ermessen des Untersuchers nur definitiv vom Gel gefüllte Anteile des Defektes eingeschlossen werden. Hierzu wird auch in den sagittalen PD gewichteten Aufnahmen der Defekt möglichst exakt nach proximal abgegrenzt, um eine Messung von signalarmen Knochen in der T2\* FFE (2 mm Schichtdicke) zu vermeiden. Die transversalen 3D WATS Aufnahmen dienen ebenfalls zur genauen Identifikation von Luftblasen und Ausschluss dieser aus dem ROI in der T2\* Aufnahme.

Die gemessenen Daten werden relativ zum Außenbereich normiert und ihrer Standardabweichung berechnet. Anhand der Tabelle 15 zeigt sich schon hier eine deutlich niedrige Streuung der Werte im Vergleich zur objektiven Messung.

Für das Gel ohne Zellen ergeben die subjektiv gewählten Messungen einen Mittelwert von  $83,11 \pm 19,13$ . Bei der geringsten Zellkonzentration von  $0,5 \times 10^5$

## 4 Ergebnisse

Zellen kommt es zu einem Signalabfall auf den Wert  $65,5 \pm 20,23$ , der bei einer Konzentrationssteigerung weiter auf  $51,44 \pm 7,15$  fällt. Den geringsten Mittelwert mit  $39,87 \pm 10,85$  erbringt die Zellkonzentration von  $10 \times 10^5$  Zellen pro ml Gel (siehe auch Anhang 9.2.3.8).

Abbildung 98 veranschaulicht die Verteilung der normierten Werte für die jeweiligen Zellkonzentrationen. Deutlich zu erkennen ist der Abfall der Signalintensität mit steigendem Gehalt der Zellen im Gel (Abbildung 99).

Es erfolgt auch hier ein Test auf Signifikanz mit Hilfe des Student - t - Tests.

Bei Test auf die Nullhypothese  $H_0$  kann signifikant gezeigt werden, dass in der subjektiven Messung die Daten der Signalintensität, bei  $p = 0,016$ , mit der Zellzahl pro ml eingebrachtem Gel korrelieren.

Tabelle 15: MRT, subjektive Messung, Mittelwert und Standardabweichung der Signalintensitäten für die Auswertung der T2\* FFE Sequenz (2 mm)

Konzentration $\times 10^5$	Mittelw. T2* (2 mm) normiert	Std. Abw. T2* (2 mm) normiert
0,00	83,11	19,13
0,50	65,5	20,23
4,75	51,44	7,15
10,00	39,87	10,85

Mittelw. = Mittelwert; Std. Abw. = Standardabweichung; mm = Millimeter

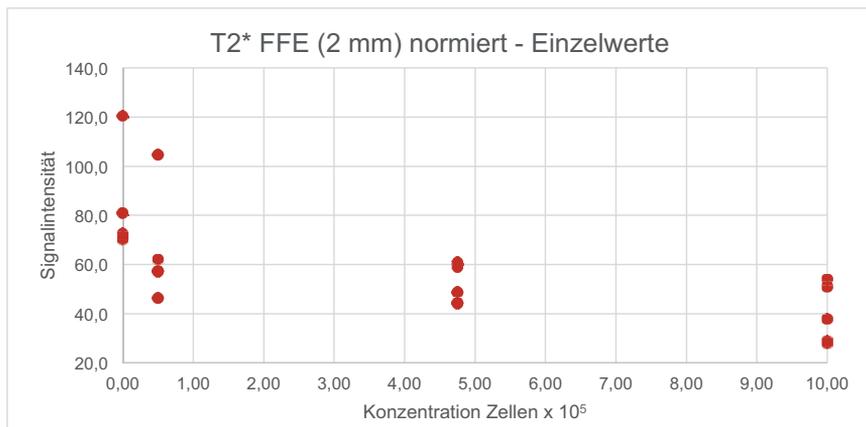


Abb. 98

MRT subjektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der normierten Einzelmesswerte in der T2\* gewichteten Sequenz (2 mm Schichtdicke).

## 4 Ergebnisse

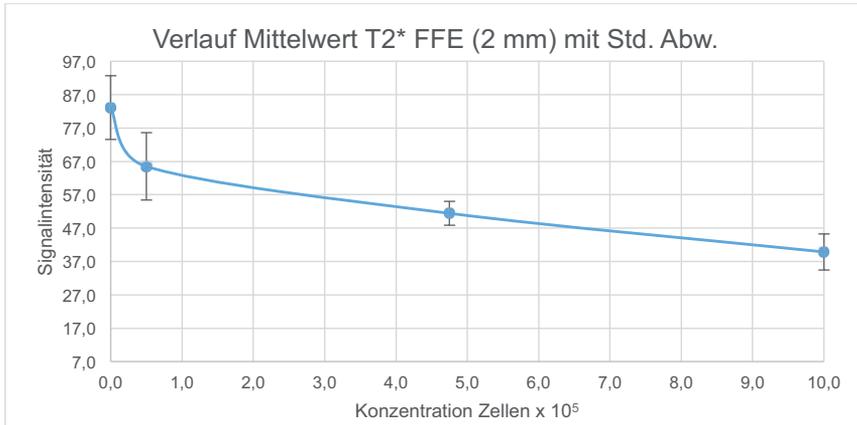


Abb. 99

MRT subjektive Messung der Signalintensitäten, Darstellung der gebildeten Mittelwerte für die verwendeten Zellmengen in der T2\* gewichteten Sequenz (2 mm Schichtdicke). Es zeigt sich ein deutlicher Abfall der Signalintensität bei zunehmender eingebrachter Zellzahl.

### 4.5 Ergänzende Untersuchungen

#### 4.5.1 Kompatibilität Zellen / Matrix

##### 4.5.1.1 Zellauswanderung aus Gelpellet im Life Cell Imaging

Das Life Cell Imaging der Gel - Zellpellets zeigt eine gute Proliferation der Zellen innerhalb des Pellets sowie ein Austreten aus diesem nach 4 h (Hd 11/13) (Abbildung 115) bis maximal 20 h (Hd 4/13) (Abbildung 128) Laufzeit. Die im Gel befindlichen Zellen beginnen sich nach ca. 1 - 4 h aus der abgelösten runden Form in eine dreieckige bis spindelförmige Morphologie zu wandeln, die den Prozess der Anhaftung darstellt. Hierbei ist ein individueller Unterschied zwischen den Proben erkennbar. Während sich bei Hd 11/13 (Abbildung 115) und Hd 4/13 (Abbildung 124) nach 4 h Versuchslaufzeit bereits über 90 % der Zellen angehaftet haben, befinden sich bei der Kultur von Hd 16/13 noch zahlreiche Zellen in einer kugelförmigen Morphologie (Abbildung 103). Es kommt in allen 3 Populationen zu multiplen Zellteilungen innerhalb der Pellets. Bei diesem Prozess lösen sich die bereits angehafteten spindelförmigen Zellen ab und wandeln sich erneut in eine runde Morphologie. Anschließend kommt es zur Zellteilung und Anhaftung der Tochterzellen. Die Zelldichte nimmt über die Zeit deutlich zu und es entsteht innerhalb des Gels ein dichter spindelförmiger Zellverband. Bei den Proben Hd 11/13

## 4 Ergebnisse

und Hd 16/13 kommt es schon in einer frühen Phase zu einem Austreten von Zellfortsätzen und vereinzelt Zellen aus dem Pellettrand. Bei der Probe Hd 4/13 kommt es erst nach 20 h zu einem eindeutigen Austritt aus dem Pellet (Abbildung 128). Hier ist jedoch zuvor eine massive Zellzunahme im Pellet erkennbar (Abbildungen 123 – 127). Das Austreten der Zellen deutet sich bei allen Populationen durch die Entsendung von Zytoplasma Fortsätzen über die Grenzen des Gelpellets hinaus an. Diese dehnen sich dort weiter aus und führen über die Zeit zum vollständigen Übertreten der Zellen in den mit Standard – Zellkulturmedium gefüllten Außenbereich. Speziell an den Erstaustrittsstellen folgen im Verlauf weitere Zellen in den Raum außerhalb des Pellets. Bei allen Populationen kann beobachtet werden, dass die bereits ausgetretenen Zellen weiter proliferieren. Mikroskopisch ist zu beobachten wie sich die Zellen von der Kulturschale ablösen, sich in einer abgerundeten Form präsentieren, zweiteilen und anschließend beide Tochterzellen sich wieder anheften.

Je höher die subjektiv wahrgenommene Konfluenz der Zellen im Pellet ist, desto zahlreicher kommt es zu Übertritten im gesamten Randbereich. Abschließend ist der Untersuchungsbereich bei Hd 4/13 nach 100 h vollständig dicht besiedelt. Die ehemaligen Pelletgrenzen sind bei anschließenden Betrachtungen nur noch durch radial verlaufende, gestromte Anordnung des Zellverbandes erkennbar (Abbildung 100). Auf der Kulturplatte bilden sich speziell im ehemaligen Pelletbereich vermehrt Zellkonglomerate (Abbildung 101).

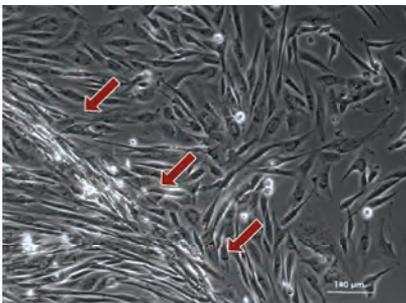


Abb. 100  
Zellkultur nach Auswachsen aus dem Gel > 100 h. Die ehemalige Pelletgrenze ist nur noch anhand der gestromten Anordnung des Zellverbandes erkennbar (→).

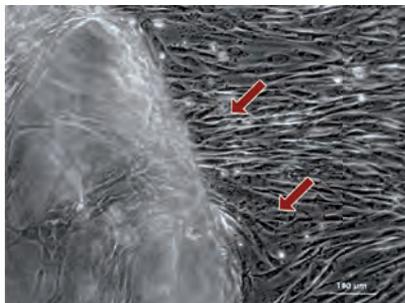


Abb. 101  
Entstandenes Zellkonglomerat im ehemaligen Pelletbereich (→)

## 4 Ergebnisse

HUND 16/13

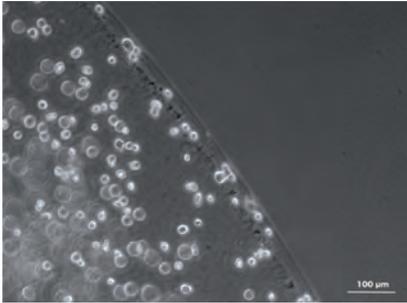


Abb. 102  
Probe Hd 16/13 zum Startzeitpunkt ( $T = 0$  h). Die stellen sich abgerundet dar und liegen in verschiedenen Ebenen im Gelpellet. Es ist eine deutliche Grenze zum Standard - Zellkulturmedium erkennbar.

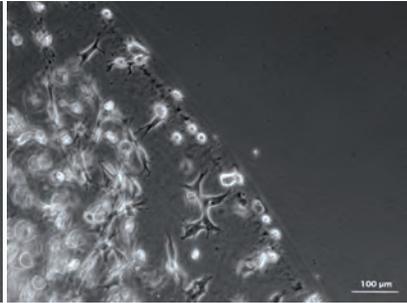


Abb. 103  
Probe Hd 16/13 nach 4 h Versuchslaufzeit. Es finden sich vermehrt polygonale bis spindelförmige Zellen im Bereich des Gelpellets. Die Grenze zum zellfreien Außenbereich ist weiterhin klar erkennbar.

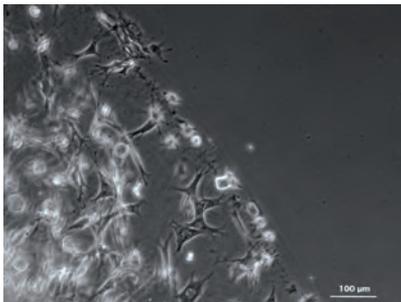


Abb. 104  
Probe Hd 16/13 nach 7 h Versuchslaufzeit. Es kommt zum Austritt erster Zellen aus dem Gelpellet. Zytoplasmafortsätze reichen über die Gelgrenzen hinaus. Zellen heften sich im oberen Bildbereich außerhalb des Pellets an. Im unteren Randbereich sind noch vermehrt abgelöste, rundliche Zellen zu erkennen.

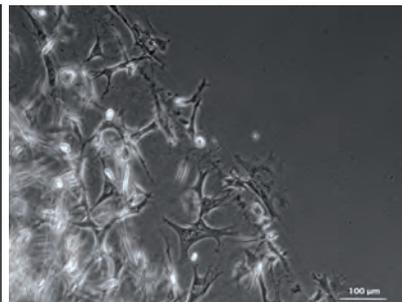


Abb. 105  
Probe Hd 16/13 nach 10 h Versuchslaufzeit. Über den gesamten Pelletrandbereich können aus dem Pellet ausgetretene Zellen beobachtet werden. In polygonaler bis dreieckiger Gestalt heften sich die Zellen außerhalb des Geles erneut an die Kulturplatte.

## 4 Ergebnisse

### HUND 16/13

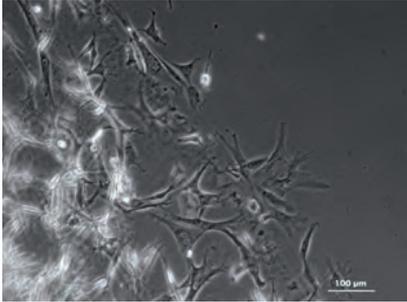


Abb. 106  
Probe Hd 16/13 nach 15 h Versuchslaufzeit.  
Es kommt zur weiteren Ausbreitung der Zellen und es können sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Pellets Mitosen beobachtet werden. Die Gelgrenzen sind nur noch andeutungsweise nachzuvollziehen.

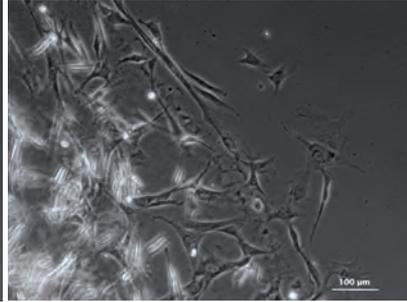


Abb. 107  
Probe Hd 16/13 nach 20 h Versuchslaufzeit.  
Durch Proliferation nimmt die Zelldichte innerhalb des Pellets zu. Die aus dem Pellet ausgetretenen Zellen dringen durch Migration und Proliferation weiter in den unbesiedelten Raum vor.

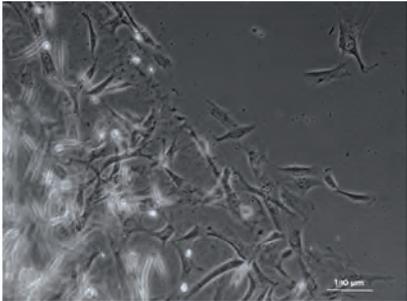


Abb. 108  
Probe Hd 16/13 nach 30 h Versuchslaufzeit.  
Es ist keine Pelletgrenze mehr erkennbar.

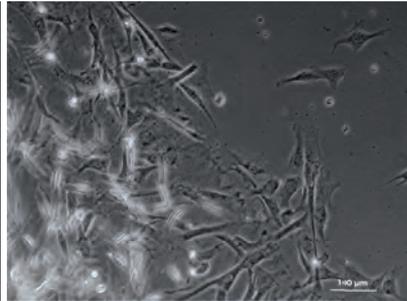


Abb. 109  
Probe Hd 16/13 nach 40 h Versuchslaufzeit.  
Es zeigen sich vermehrt proliferierende abgelöste Zellen (helle Kreise) außerhalb des Gelpellets

## 4 Ergebnisse

### HUND 16/13

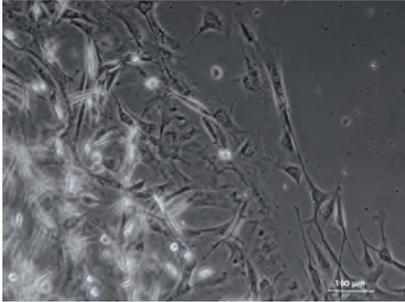


Abb. 110  
Probe Hd 16/13 nach 50 h Versuchslaufzeit.  
Die Zellen stehen über weitläufige  
Zytoplasmfortsätze in Kontakt und breiten  
sich weiter aus.

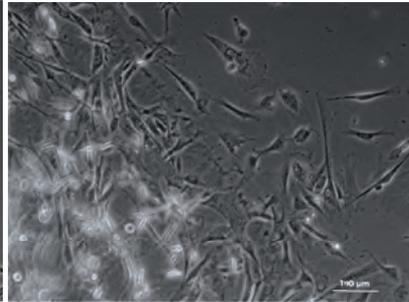


Abb. 111  
Probe Hd 16/13 nach 60 h Versuchslaufzeit.  
Die ausgetretenen Zellen erstrecken sich zu  
diesem Zeitpunkt bereits bis in die  
Ranbereiche des Beobachtungsfeldes.

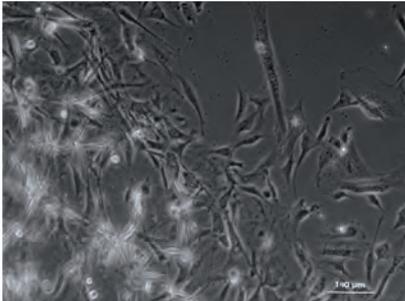


Abb. 112  
Probe Hd 16/13 nach 70 h Versuchslaufzeit.

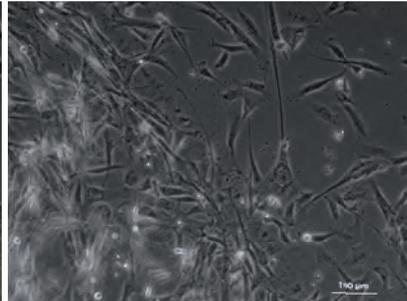


Abb. 113  
Probe Hd 16/13 nach 80 h Versuchslaufzeit.  
Es liegt eine lockere Besiedlung des  
gesamten Beobachtungsfeldes vor.

## 4 Ergebnisse

### HUND 11/13

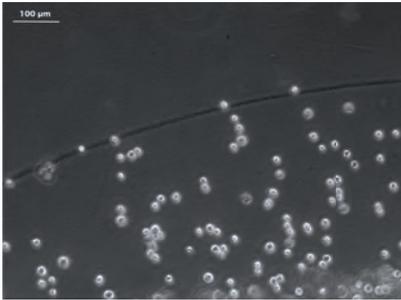


Abb. 114  
Probe Hd 11/13 zum Startzeitpunkt ( $T = 0$  h). Die abgerundeten Zellen liegen in verschiedenen Ebenen im Gelpellet. Einige Zellen befinden sich im Grenzbereich, es ist jedoch eine deutliche Grenze zum Standard-Zellkulturmedium erkennbar.

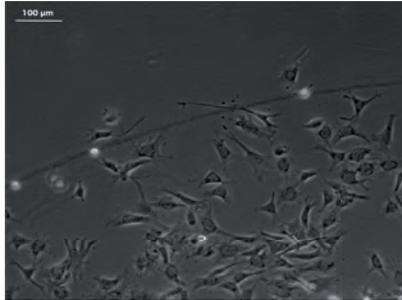


Abb. 115  
Probe Hd 11/13 nach 4 h Versuchslaufzeit. Die Zellen zeigen bereits nach 4 h eine polygonale bis spindelförmige Struktur im Gelpellet. Zytoplasma Fortsätze reichen über die Gelgrenze in den Außenbereich. Zwei Zellen haben das Pellet bereits vollständig verlassen. Eine weitere Zellen liegt bereits in abgerundeter Form im Außenbereich vor.

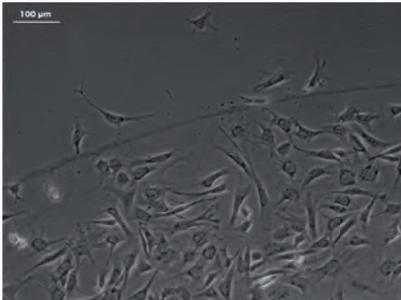


Abb. 116  
Probe Hd 11/13 nach 7 h Versuchslaufzeit. Die Zellen proliferieren innerhalb und außerhalb des Pellets. Die Pelletgrenzen sind noch klar erkennbar.

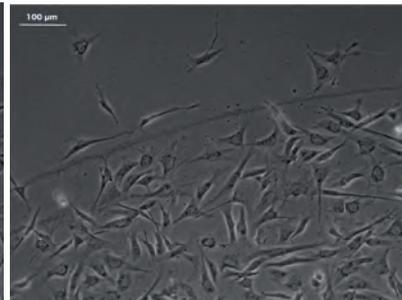


Abb. 117  
Probe Hd 11/13 nach 10 h Versuchslaufzeit. Die Zelldichte innerhalb und außerhalb des Pellets nimmt auf Grund von zu beobachtenden Mitosen deutlich zu.

## 4 Ergebnisse

### HUND 11/13

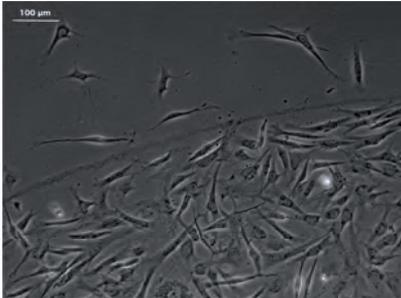


Abb. 118  
Probe Hd 11/13 nach 15 h Versuchslaufzeit.  
Die Zellen innerhalb und außerhalb des Pellets zeigen deutliche Zytoplasmafortsätze.

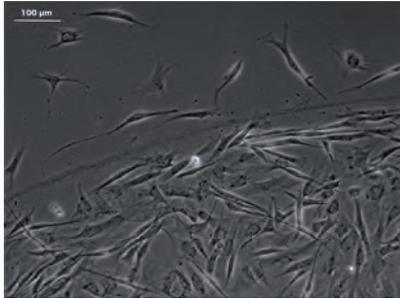


Abb. 119  
Probe Hd 11/13 nach 20 h Versuchslaufzeit.  
Elf spindelförmige bis polygonale Zellen haben das Pellet bereits komplett verlassen und sich im Außenbereich an den Kulturboden angeheftet.

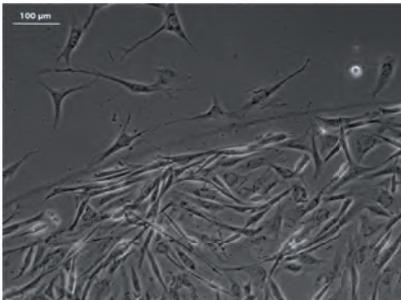


Abb. 120  
Probe Hd 11/13 nach 30 h Versuchslaufzeit.  
Es kommt zur beginnenden Auflösung der Pelletgrenzen.

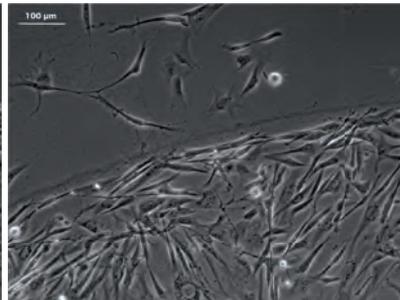


Abb. 121  
Probe Hd 11/13 nach 40 h Versuchslaufzeit.  
Auf Grund von Proliferation nimmt die Zelldichte innerhalb des Pellets weiterhin zu. Im Randbereich ordnen sich die spindelförmigen Zellen parallel zur Pelletgrenze an.

## 4 Ergebnisse

### HUND 11/13

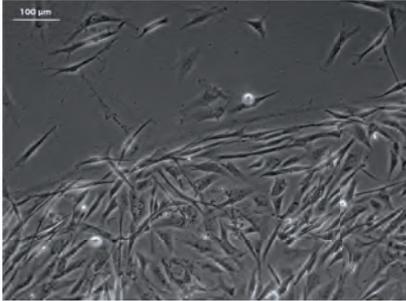


Abb. 122  
Probe Hd 11/13 nach 48 h Versuchslaufzeit.  
Die ausgetretenen Zellen liegen locker verteilt  
im Außenbereich vor und stehen über  
Zytoplasmafortsätze in Verbindung.

### HUND 4/13

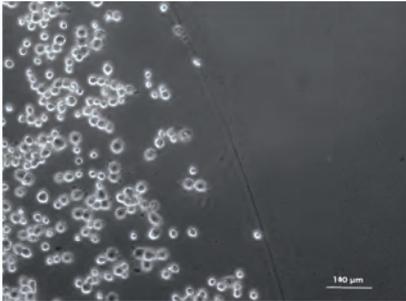


Abb. 123  
Probe Hd 4/13 zum Startzeitpunkt ( $T = 0$  h).  
Die abgerundeten Zellen liegen in  
verschiedenen Ebenen im Gelpellet.  
Einige Zellen befinden sich im Grenzbereich,  
es ist jedoch eine deutliche Grenze zum Standard -  
Zellkulturmedium erkennbar.

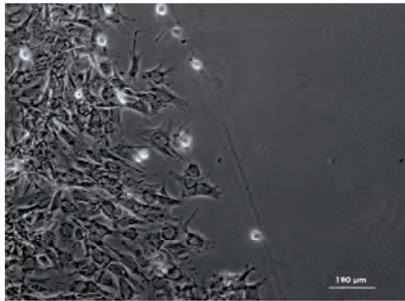


Abb. 124  
Probe Hd 4/13 nach 4 h Versuchsdauer.  
Ein Großteil der Zellen besitzt eine polygonale  
bis spindelförmige Morphologie, hat sich  
somit an den Kulturboden angeheftet. Anhand  
von sich ablösenden Zellen und Anheftung  
zweier Tochterzellen sind zahlreiche Mitosen  
innerhalb des Gelpellets zu erkennen.

## 4 Ergebnisse

### HUND 4/13

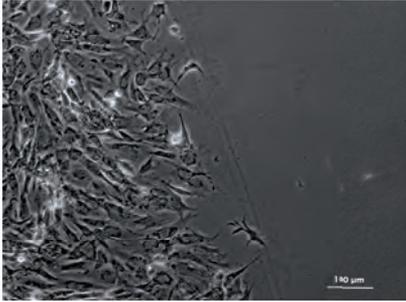


Abb. 125  
Probe Hd 4/13 nach 7 h Versuchsdauer.  
Die Zelldichte im Pellet erhöht sich subjektiv und einige Zellen entsenden bereits schmale Zytoplasmfortsätze in den Außenbereich.

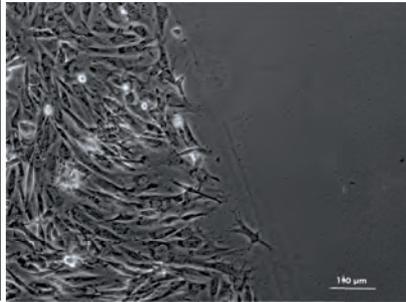


Abb. 126  
Probe Hd 4/13 nach 10 h Versuchsdauer.

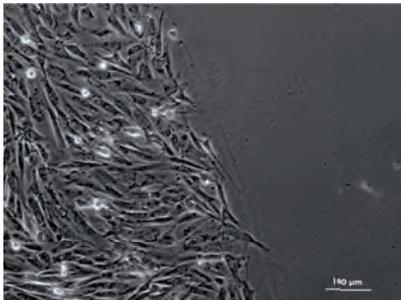


Abb. 127  
Probe Hd 4/13 nach 15 h Versuchsdauer.  
Die Pelletgrenzen sind nur noch andeutungsweise zu erkennen. Es liegt ein dichter Zellverband innerhalb des Pellets vor.

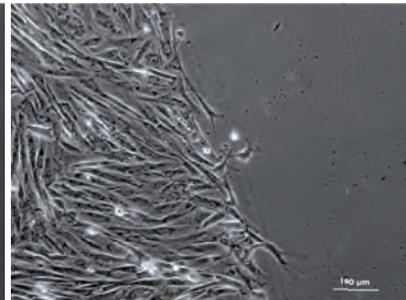


Abb. 128  
Probe Hd 4/13 nach 20 h Versuchsdauer.  
Zytoplasma Fortsätze der Zellen reichen deutlich aus dem Pellet heraus.

## 4 Ergebnisse

HD 4/13

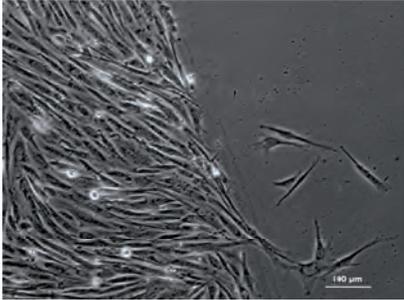


Abb. 129  
Probe Hd 4/13 nach 20 h Versuchsdauer.  
7 -8 Zellen sind aus dem Pellet ausgetreten .

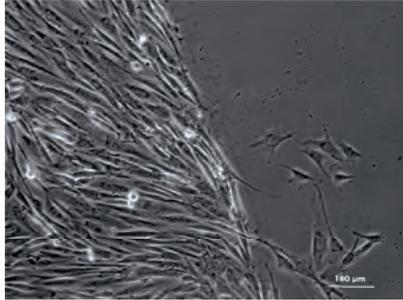


Abb. 130  
Probe Hd 4/13 nach 40 h Versuchsdauer.  
Es kommt zum weiteren Austritten von Zellen  
und einer massiven Zellzahlzunahme im  
Pellet.

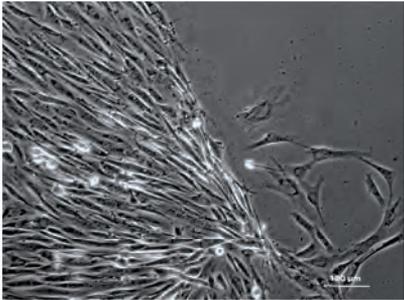


Abb. 131  
Probe Hd 4/13 nach 50 h Versuchsdauer.  
Die ausgetretenen Zellen breiten sich weiter  
aus. Innerhalb des Pellets liegt eine dicht  
gewachsene Zellkultur vor

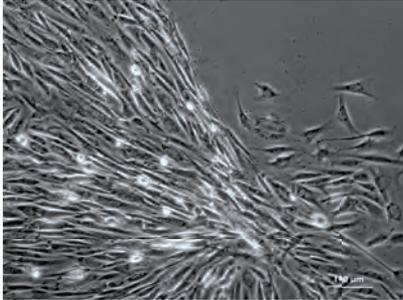


Abb. 132  
Probe Hd 4/13 nach 60 h Versuchsdauer.

## 4 Ergebnisse

HD 4/13

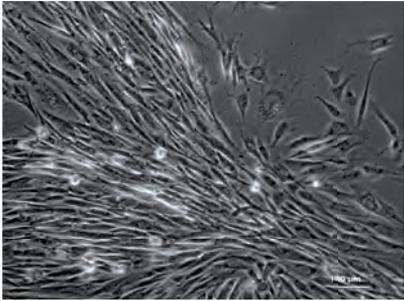


Abb. 133  
Probe Hd 4/13 nach 70 h Versuchsdauer.  
Die ausgetretenen Zellen bedecken nun fast vollständig den Beobachtungsbereich der Zellkultur.

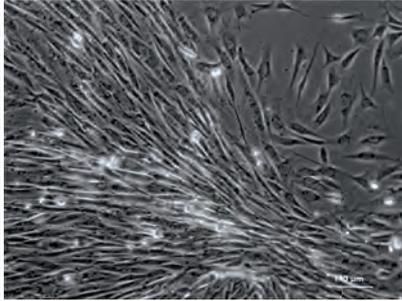


Abb. 134  
Probe Hd 4/13 nach 80 h Versuchsdauer.  
Es liegt eine vollständige lockere Besiedlung der Kulturschale vor.

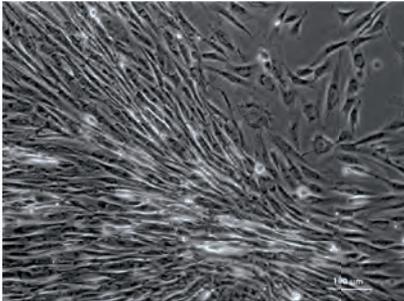


Abb. 135  
Probe Hd 4/13 nach 90 h Versuchsdauer.

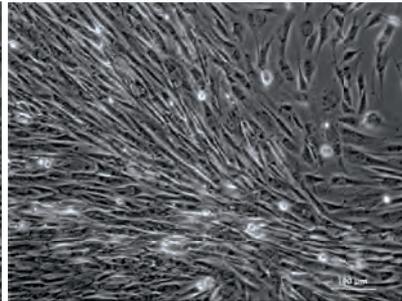


Abb. 136  
Probe Hd 4/13 nach 100 h Versuchsdauer.  
Der komplette Beobachtungsbereich ist dicht besiedelt von spindelförmigen Zellen.

## 4 Ergebnisse

### 4.5.1.2 Zytotoxizitätstest im Life Cell Imaging (20GNL<sup>®</sup>)

Die exemplarische Untersuchung von der Zellpopulation Hd 16/13 zeigt eine hohe Vitalität der Zellen nach 1 h unter Inkubation im 20GNL<sup>®</sup> / DMEM Gemisch. Anhand der subjektiv ausgewerteten lichtmikroskopischen Untersuchung sind keine Veränderungen zum Ausgangszustand zu beobachten. Es besteht ein dichter Zellverband mit spindelförmigen bis polygonalen Zellen (Abbildung 138). Auch nach 2 h Versuchslaufzeit besteht ein vitaler Zellverband von spindelförmigen und polygonalen Zellen. Nach 5 h Inkubation zeigen die Zellen eine Schrumpfung des Zytoplasmas und ihrer Fortsätze. Um einige Zellen sind helle Bereiche zu erkennen. Es finden sich vermehrt abgelöste, rundliche Zellformen und der Zellverband erscheint zu diesem Zeitpunkt weniger dicht.

10 h nach Versuchsbeginn hat die Zelldichte deutlich abgenommen. Die Anzahl der abgerundeten, nicht mehr an der Kulturplatte anhaftenden Zellen ist weiter gestiegen. Die verbleibenden Zellen besitzen ein geschrumpftes Zytoplasma und helle Randsäume (Abbildung 140). Nach 24 h Inkubation sind lichtmikroskopisch keine vitalen, angehafteten Zellen mehr nachzuvollziehen.

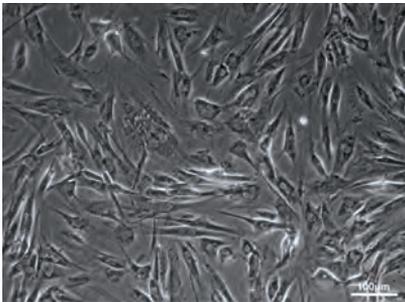


Abb. 137  
Zytotoxizitätstest 20 GNL<sup>®</sup> / DMEM Hd 16/13  
Life Cell Imaging  
Versuchsbeginn (T = 0 h), die spindelförmigen  
bis polygonalen Zellen liegen in einem dichten  
Zellverband.

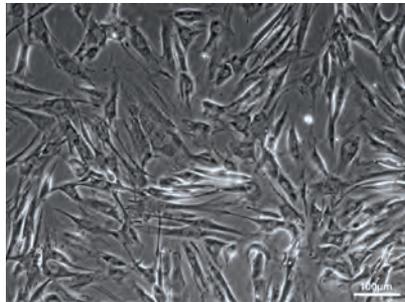


Abb. 138  
Zytotoxizitätstest 20 GNL<sup>®</sup> / DMEM Hd 16/13  
Life Cell Imaging  
T = 1 h, die spindelförmigen bis polygonalen  
Zellen liegen in einem dichten Zellverband. Es  
zeigen sich keine Veränderungen in der  
Zellkultur.

## 4 Ergebnisse

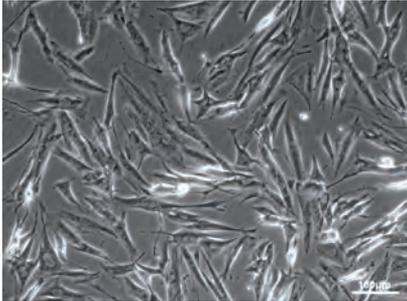


Abb. 139  
Zytotoxizitätstest 20 GNL® / DMEM Hd 16/13 Life Cell Imaging  
T = 5 h, der Zellverband lockert sich auf und es zeigen sich vermehrt helle Randsäume um die spindelförmigen Zellen. Die Anzahl der abgerundeten, sich abgelösten Zellen hat im Vergleich zur Voraufnahme zugenommen

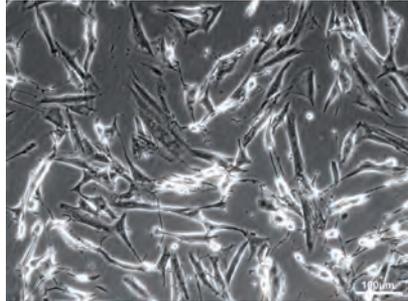


Abb. 140  
Zytotoxizitätstest 20 GNL® / DMEM Hd 16/13 Life Cell Imaging  
T = 10 h, es zeigt sich ein loser Zellverband. Um die verbliebenen, stark geschrumpften Zellen bilden sich vermehrt helle Randsäume. Die Anzahl der abgerundeten, sich abgelösten Zellen nimmt weiter zu.

### 4.5.1.3 MTT Vergleichstest

#### (LM (20GNL®); DMEM; Standard - Zellkulturmedium)

Tabelle 16 beinhaltet die dreifach Messungen für Tag 0, 1, 2, 3 der verschiedenen Zellpopulationen (Hd 4/13, 11/13 und 16/13). Für alle drei Spenderpopulationen werden die Werte jeweils in die Proben inkubiert mit Lösungsmittel 20GNL® + DMEM (LM), die Proben mit DMEM und die Proben in Standard – Zellkulturmedium (Medium) gegliedert. Des Weiteren wird ein dreifacher Blankwert (Messung ohne Zellen) aufgeführt.

Der aus den Einzelwerten entstehende arithmetische Mittelwert (Mittelw.) sowie die Standardabweichung (Std. Abw.) befindet sich bei zwei Messungen nicht im 80 % Erwartungsbereich der mittleren Standardabweichung, getestet nach dem Chi - Quadrat Test ( Hd 4/13 Tag 2 DMEM, Hd 11/13 Tag 3 LM). Die daraus abweichenden Werte werden bei den weiteren Auswertungen als Ausreißer eliminiert.

## 4 Ergebnisse

Tabelle 16 Messwerte MTT Vergleichstest, Dreifachmessung der Absorption über Tag 0 – 3 mit Ermittlung der arithmetischen Mittelwerte (Mittelw.) und der Standardabweichungen (Std. Abw.) für die Inkubation mit Lösungsmittel in DMEM (LM), DMEM und Standard – Zellkulturmedium (Medium), sowie dem gemessenen Blank Wert.

Tabelle 16.1

Hd 4/13	Inkubation				Mittelw.	Std. Abw.	%
<b>Tag 0</b>	LM	0,258	0,235	0,227	<b>0,240</b>	0,013	5%
	DMEM	0,197	0,242	0,233	<b>0,224</b>	0,019	9%
	Medium	0,260	0,290	0,278	<b>0,276</b>	0,012	4%
<b>Tag 1</b>	LM	0,352	0,352	0,270	<b>0,325</b>	0,039	12%
	DMEM	0,378	0,319	0,259	<b>0,319</b>	0,049	15%
	Medium	0,706	0,687	0,573	<b>0,655</b>	0,059	9%
<b>Tag 2</b>	LM	0,601	0,539	0,531	<b>0,557</b>	0,031	6%
	DMEM	<b>0,611</b>	0,412	0,376	<b>0,466</b>	0,103	<b>22%</b>
	DMEM'		0,412	0,376	<b>0,394</b>	0,018	<b>5%</b>
<b>Tag 3</b>	Medium	1,204	0,848	0,815	<b>0,956</b>	0,176	18%
	LM	0,774	0,810	0,722	<b>0,769</b>	0,036	5%
	DMEM	0,481	0,432	0,471	<b>0,461</b>	0,021	5%
	Medium	1,430	1,257	1,443	<b>1,377</b>	0,085	6%

Tabelle16.2

Hd 11/13	Inkubation				Mittelw.	Std. Abw.	%
<b>Tag 0</b>	LM	0,204	0,218	0,271	<b>0,231</b>	0,029	12%
	DMEM	0,188	0,184	0,182	<b>0,185</b>	0,002	1%
	Medium	0,235	0,25	0,229	<b>0,238</b>	0,009	4%
<b>Tag 1</b>	LM	0,217	0,192	0,198	<b>0,202</b>	0,011	5%
	DMEM	0,225	0,237	0,217	<b>0,226</b>	0,008	4%
	Medium	0,378	0,332	0,332	<b>0,347</b>	0,022	6%
<b>Tag 2</b>	LM	0,359	0,324	0,296	<b>0,326</b>	0,026	8%
	DMEM	0,364	0,338	0,383	<b>0,362</b>	0,018	5%
	Medium	0,221	0,215	0,212	<b>0,216</b>	0,004	2%
<b>Tag 3</b>	LM	<b>0,23</b>	0,434	0,477	<b>0,380</b>	0,108	<b>28%</b>
	LM'		0,434	0,477	<b>0,456</b>	0,022	<b>5%</b>
	DMEM	0,423	0,28	0,312	<b>0,338</b>	0,061	18%
	Medium	0,301	0,298	0,323	<b>0,307</b>	0,011	4%

## 4 Ergebnisse

Tabelle 16.3

Hd 16/13	Inkubation				Mittelw.	Std. Abw.	%
<b>Tag 0</b>	LM	0,201	0,229	0,243	<b>0,224</b>	0,017	8%
	DMEM	0,256	0,267	0,249	<b>0,257</b>	0,007	3%
	Medium	0,258	0,265	0,265	<b>0,263</b>	0,003	1%
<b>Tag 1</b>	LM	0,357	0,34	0,383	<b>0,360</b>	0,018	5%
	DMEM	0,372	0,305	0,328	<b>0,335</b>	0,028	8%
	Medium	0,359	0,393	0,425	<b>0,392</b>	0,027	7%
<b>Tag 2</b>	LM	0,59	0,525	0,473	<b>0,529</b>	0,048	9%
	DMEM	0,541	0,551	0,592	<b>0,561</b>	0,022	4%
	Medium	0,658	0,503	0,549	<b>0,570</b>	0,065	11%
<b>Tag 3</b>	LM	0,635	0,777	0,673	<b>0,695</b>	0,060	9%
	DMEM	0,649	0,573	0,484	<b>0,569</b>	0,067	12%
	Medium	0,575	0,838	0,561	<b>0,658</b>	0,127	19%
<b>Blank</b>		0,157	0,162	0,159	<b>0,159</b>	0,002	1%

Tabelle 17 MTT Vergleichstest,  $D_1$  Werte für die verschiedenen Inkubationen der verwendeten Zellpopulationen

Tabelle 17.1

$D_1$			
Hd 4/13	LM	DMEM	Medium
<b>Tag 0</b>	0,076	0,074	0,119
<b>Tag 1</b>	0,166	0,16	0,528
<b>Tag 2</b>	0,38	0,235	0,689
<b>Tag 3</b>	0,615	0,312	1,271

$D_1$  = Delta 1 Wert, ergibt sich aus der Differenz zwischen dem gebildeten Mittelwert der Absorption und dem Mittelwert der Blankmessung; Hd = Hund; LM = Lösungsmittel; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium; Medium = Standard - Zellkulturmedium

Tabelle 17.2

$D_1$			
Hd 11/13	LM	DMEM	Medium
<b>Tag 0</b>	0,059	0,025	0,076
<b>Tag 1</b>	0,039	0,066	0,173
<b>Tag 2</b>	0,165	0,205	0,056
<b>Tag 3</b>	0,2965	0,153	0,142

$D_1$  = Delta 1 Wert, ergibt sich aus der Differenz zwischen dem gebildeten Mittelwert der Absorption und dem Mittelwert der Blankmessung; Hd = Hund; LM = Lösungsmittel; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium; Medium = Standard - Zellkulturmedium

## 4 Ergebnisse

Tabelle 17.3

<b>D<sub>1</sub></b>			
<b>Hd 16/13</b>	<b>LM</b>	<b>DMEM</b>	<b>Medium</b>
<b>Tag 0</b>	0,07	0,097	0,106
<b>Tag 1</b>	0,198	0,169	0,234
<b>Tag 2</b>	0,366	0,392	0,39
<b>Tag 3</b>	0,514	0,414	0,416

D<sub>1</sub> = Delta 1 Wert, ergibt sich aus der Differenz zwischen dem gebildeten Mittelwert der Absorption und dem Mittelwert der Blankmessung; Hd = Hund; LM = Lösungsmittel; DMEM = Dulbecco's Modified Egel Medium; Medium = Standard - Zellkulturmedium

Tabelle 18 MTT - Vergleichstest, Steigung m der Regressionsgeraden, Determinationskoeffizient r<sup>2</sup>

	<b>m<sub>(LM)</sub></b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>m<sub>(DMEM)</sub></b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>m<sub>(Medium)</sub></b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>Hd 4/13</b>	0,183	0,967	0,079	0,999	0,361	0,956
<b>Hd 11/13</b>	0,084	0,839	0,052	0,683	0,008	0,036
<b>Hd 16/13</b>	0,150	0,998	0,117	0,910	0,109	0,939

m = Steigung der Regressionsgeraden; r<sup>2</sup> = Determinationskoeffizient; Hd = Hund; LM = Lösungsmittel; DMEM = Dulbecco's Modified Egel Medium; Medium = Standard - Zellkulturmedium

Tabelle 19 MTT – Vergleichstest, Berechnung von Delta m

	<b>Delta m<sub>(Medium) - (LM)</sub></b>	<b>Delta m<sub>(Medium) - (DMEM)</sub></b>	<b>Delta m<sub>(LM) - (DMEM)</sub></b>
<b>Hd 4/13</b>	0,179	0,283	0,104
<b>Hd 11/13</b>	-0,076	-0,044	0,032
<b>Hd 16/13</b>	-0,041	-0,009	0,033

D<sub>m</sub> = Delta der Steigungen m (D<sub>m</sub> = m<sub>-E</sub> - m<sub>+E</sub>); Hd = Hund; LM = Lösungsmittel; DMEM = Dulbecco's Modified Egel Medium; Medium = Standard - Zellkulturmedium

Die dargestellten Regressionsgeraden ergeben sich aus den Delta D<sub>1</sub> Werten (Tabelle 17) der gemittelten Absorptionmesswerte und dem mittleren Blankwert im Bezug auf die Zeit. Ihre Steigung, die ein Ausdruck der Proliferationskapazität der Zellen darstellt, ist in Tabelle 18 dargestellt. Die bei Hd 4/13 und 16/13 hohen Determinationskoeffizienten r<sup>2</sup> (0,95 > r<sup>2</sup> > 1) (Tabelle 18) liegen im vorgegebenen Bereich für eine sehr gute Approximation der Werte. Bei der Zellpopulation von Hd 11/13 kommt es in den mit DMEM und Standard – Zellkulturmedium inkubierten Proben zu einer breiten Streuung um die gebildete Grade. Der Regressionskoeffizient r<sup>2</sup> ist somit mit 0,683 und 0,036 gering.

## 4 Ergebnisse

Die Graphen (Abbildung 141 - 143) zeigen jeweils den Vergleich zwischen den in Lösungsmittel + DMEM, DMEM und Standard – Zellkulturmedium inkubierten Zellen einer Spenderlinie im Verlauf. Dargestellt sind die  $D_1$  Werte sowie die durch Regression in erster Näherung gebildeten Interpolationsgeraden.

Anhand der Regressionsgeraden und ihrer Steigung  $m$  (Tabelle 18) bei Annahme eines linearen Verlaufes kann die Proliferationskapazität der Zellpopulationen interindividuell (Abbildung 141 - 143) ( $\Delta m D_m$ ) und interspezifisch (Abbildung 144 - 146) verglichen werden (Tabelle 18 und 19). Unterschiede, die durch Schwankungen der Anfangszellzahl auftreten können, werden durch dieses Verfahren vernachlässigt. Insgesamt ist auffällig, dass alle Graphen ein wesentlich schwächeres Wachstum als beim MTT Test (Vergleich: + E gegen – E) zeigen.

Die Graphen der Zellpopulation Hd 4/13 zeigen eine erkennbare Divergenz der Regressionsgeraden (Abbildung 141). Während die Zellen der Standard – Zellkulturmedium Reihe mit einem Wert von  $m_{\text{Medium}} = 0,361$  proliferieren, zeigen die Kulturen der in Lösungsmittel inkubierten Zellen mit  $m_{\text{LM}} = 0,183$  eine geringere Zunahme der Absorption. Die allein mit DMEM inkubierten Proben schneiden mit  $m_{\text{DMEM}} = 0,079$  am schlechtesten ab (Tabelle 18). Hd 11/13 zeigt insgesamt sehr indifferente und niedrige Wachstumswerte (Abbildung 142). Bei Betrachtung der errechneten Regressionsgeraden ergibt sich das beste Wachstum für die mit Lösungsmittel inkubierten Zellen ( $m_{\text{LM}} = 0,084$ ), darauf folgen die mit DMEM ( $m_{\text{DMEM}} = 0,052$ ) und Standard – Zellkulturmedium ( $m_{\text{Medium}} = 0,008$ ) versetzten Proben (Tabelle 18). Die Zellen der Reihe Hd 16/13 weisen ein ähnliches Wachstum für alle drei Vergleichsproben auf (Abbildung 143). Bei genauerer Betrachtung zeigt die Lösungsmittel Probe mit  $m_{\text{LM}} = 0,150$  ein geringfügig stärkeres Wachstum als die DMEM ( $m_{\text{DMEM}} = 0,117$ ) und Standard – Zellkulturmedium ( $m = 0,109$ ) Proben (Tabelle 18).

In der statistischen Analyse der Steigungen  $m$  kann auf Grund der geringen Probenanzahl von drei nur Stammzellpopulationen mit lediglich 86 % Wahrscheinlichkeit ( $p = 0,137$ ) nachgewiesen werden, dass das Lösungsmittel interindividuell keinen nachweisbar negativen Einfluss gegenüber dem Standard - Zellkulturmedium auf die Zunahme der Absorptionswerte über die Zeit hat (einseitiger Student - t - Test für verbundene Stichproben). Mit einer 91 %igen Wahrscheinlichkeit ( $p = 0,090$ ) hat auch die 1 h Inkubation mit reinem DMEM in diesem Test keinen negativen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Zellen.

## 4 Ergebnisse

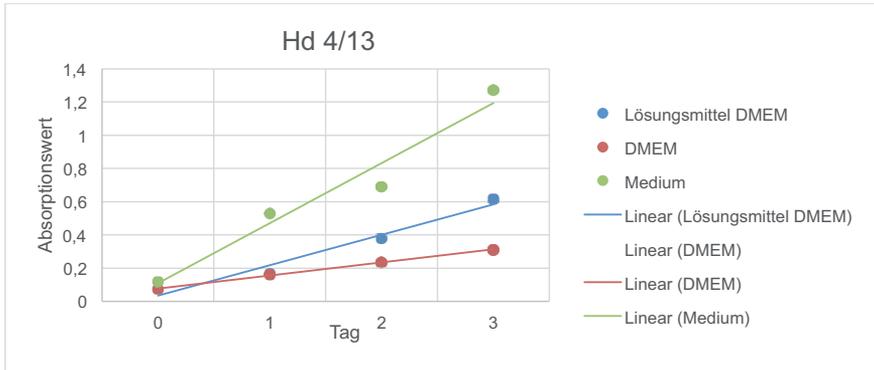


Abb. 141

MTT Vergleichstest, Zellpopulation Hd 4/13: Die Graphen zeigen den Vergleich der Absorptionswerte zwischen den in Lösungsmittel mit DMEM, in DMEM und in Standard - Zellkulturmedium inkubierten Zellen im Verlauf. Als Punkte dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1 \Delta 1 = \text{Mittelwert} - \text{Blank}$ ), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

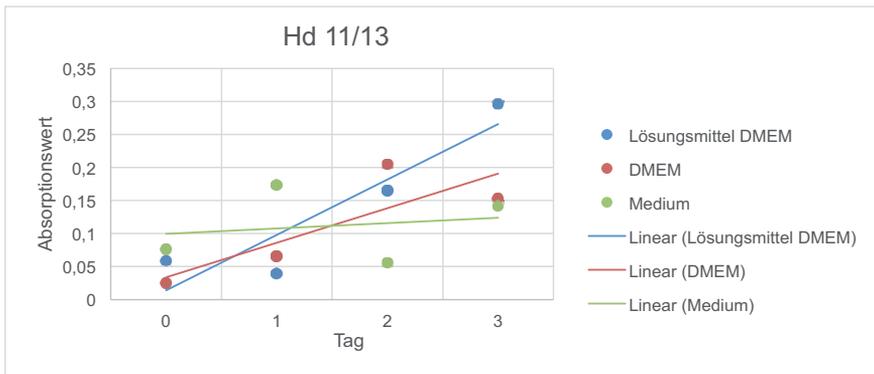


Abb. 142

MTT Vergleichstest, Zellpopulation Hd 11/13: Die Graphen zeigen den Vergleich der Absorptionswerte zwischen den in Lösungsmittel mit DMEM, in DMEM und in Standard - Zellkulturmedium inkubierten Zellen im Verlauf. Als Punkte dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1 \Delta 1 = \text{Mittelwert} - \text{Blank}$ ), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden. Bei dieser Zelllinie ist eine deutliche Streuung der  $D_1$  Werte um die Regressionsgeraden zu erkennen.

## 4 Ergebnisse

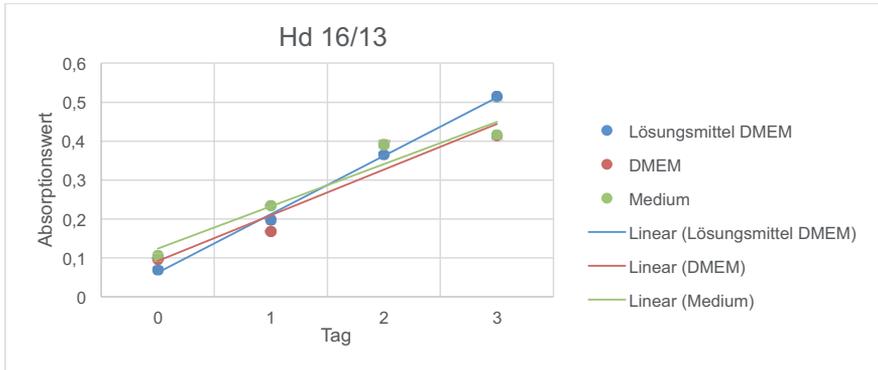


Abb. 143

MTT Vergleichstest, Zellpopulation Hd 16/13: Die Graphen zeigen den Vergleich der Absorptionswerte zwischen den in Lösungsmittel und DMEM, in DMEM und in Standard - Zellkulturmedium inkubierten Zellen im Verlauf. Als Punkte dargestellt sind die  $D_1$  Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank), sowie die durch Regression in erster Näherung gebildete linearen Interpolationsgeraden.

Alternativ kann bei der statistischen Auswertung der Einzelwerte ( $D_1$ ) zwischen den verschiedenen inkubierten Zelllinien in der einseitigen Überprüfung der Nullhypothese  $H_0$ , signifikant ( $p = 0,025$ ) ein negativer Einfluss der 1 h Inkubation mit Lösungsmittel im Vergleich zum Standard - Zellkulturmedium auf das Proliferationsverhalten der Zellen ausgeschlossen werden. Ebenfalls ergibt sich ein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,016$ ) für die Wiederlegung der These, dass die Inkubation mit DMEM einen negativen Einfluss gegenüber dem Standard – Zellkulturmedium aufweist. Das höhere Signifikanzniveau ergibt sich aus der veränderten Stichprobengröße und der ermittelten Standardabweichung, beinhaltet jedoch das systemische Risiko der bereits beschriebenen Beeinflussung durch variierende Anfangszellzahlen.

Bei einem interspezifischen Vergleich zeigt Hd 11/13 in allen drei Inkubationen das geringste Proliferationspotenzial. Die Graphen der Abbildungen 144 bis 146 zeigen jeweils die 3 Zellproben im Vergleich. Interspezifisch kann anhand der ermittelten Werte und der Regressionsgeraden ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Spenderzellen beobachtet werden. Unter Einbeziehung der Ergebnisse des Lösungsmittels und des Standard – Zellkulturmediums beweist der Pearson Korrelationstest eine hohe Abhängigkeit der Messergebnisse von der verwendeten Stammzellprobe ( $r = 0,907$ ). Des Weiteren kann im einseitig verbundenen T - Test für das Wachstumsverhalten festgestellt werden, dass der Einfluss der Stammzellprobe im Vergleich zum Lösungsmittel signifikant ( $p = 0,029$ ) höher ist (Standard – Zellkulturmedium als negativ Kontrolle).

## 4 Ergebnisse

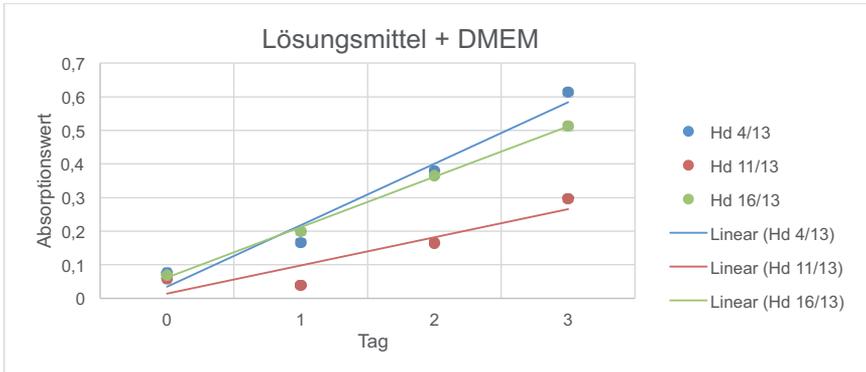


Abb. 144  
MTT Vergleichstest, interspezifischer Vergleich der Absorptionsmesswerte der mit Lösungsmittel (LM) und DMEM inkubierten Zellen. Dargestellt sind die  $D_1$  - Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank) der drei verwendeten Zellpopulationen, sowie die daraus gebildeten linearen Regressionsgeraden über die Zeit.

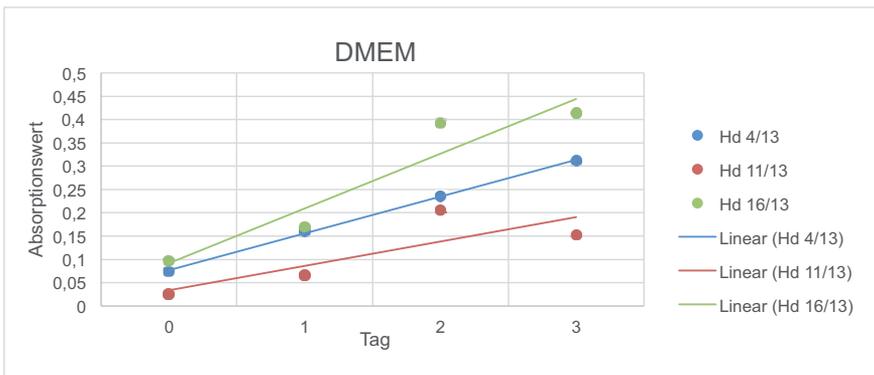


Abb. 145  
MTT Vergleichstest, interspezifischer Vergleich der Absorptionsmesswerte der mit DMEM inkubierten Zellen. Dargestellt sind die  $D_1$  - Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank) der drei verwendeten Zellpopulationen, sowie die daraus gebildeten linearen Regressionsgeraden über die Zeit.

## 4 Ergebnisse

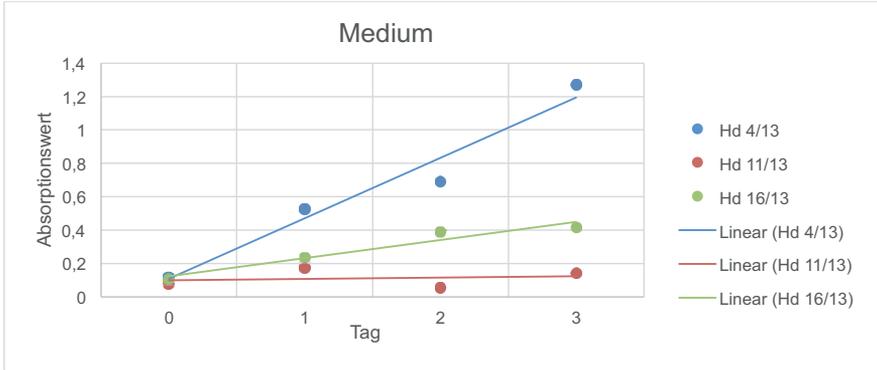


Abb. 146

MTT Vergleichstest, interspezifischer Vergleich der Absorptionssmesswerte der mit Standard - Zellkulturmedium inkubierten Zellen. Dargestellt sind die  $D_1$  - Werte ( $D_1$  Delta 1 = Mittelwert - Blank) der drei verwendeten Zellpopulationen, sowie die daraus gebildeten linearen Regressionsgraden über die Zeit.

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeines

Ziel und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ist es, vier verschiedene Konzentrationen von mit Endorem<sup>®</sup> markierten Stammzellen innerhalb eines Knorpeldefektes am Kniegelenk des Hundes nachzuweisen. Während zahlreiche Arbeiten zum magnetresonanztomographischen Nachweis von markierten Zellen im Gelphantom (Küstermann et al. 2008, Veit 2011, Kolecka 2014) oder an Kleinsäugetern (Sykova u. Jendelova 2006) mit Magnetresonanztomographen bis hin zu 7 Tesla vorliegen, soll in dieser Arbeit die klinisch umsetzbare Möglichkeit der Darstellung und Quantifizierung von Stammzellen innerhalb einer komplexen Struktur wie dem kaninen Kniegelenk nachgewiesen werden. Hierfür wird bei allen Methoden großer Wert auf eine klinische Durchführbarkeit gelegt. Des Weiteren besteht die Aufgabe der Studie in der ausführlichen Untersuchung der Verträglichkeit einer Endorem<sup>®</sup> - Markierung auf die ADMSCs sowie der Unschädlichkeit und klinischen Verarbeitungstauglichkeit des Zwei - Komponenten Kollagengels der Firma Amedrix.

### 5.2 Methodik der Untersuchung

#### 5.2.1 Studiendesign

Die Planung des Studiendesigns erfolgt einerseits unter Berücksichtigung der klinischen Variabilität der Patienten, soll jedoch andererseits durch Vergleichbarkeit in der Durchführung und ausreichende Gruppengrößen die statistische Auswertung ermöglichen.

Über die Ausbeute und Proliferationskapazität mesenchymaler Stammzellen des Hundes liegen derzeit variable Informationen vor. In der Planung der vorliegenden Studie stellt die klinische Umsetzbarkeit und die Repräsentation des alltäglichen Patienten eine entscheidende Rolle dar. Um eine möglichst aussagekräftige Studie durchzuführen, soll die bereits aus anderen Spezies bekannte Diversität zwischen den Individuen mit der Wahl von fünf verwendeten Stammzellpopulationen wiedergeben werden. Diese 5 Individuen ermöglichen einen Vergleich zwischen den Spenderpopulationen in den verschiedenen Laboruntersuchungen. Die hieraus resultierenden Unterschiede in Proliferations- und Wachstumsraten erschweren zwar einerseits die statistische Auswertung, geben jedoch einen guten Einblick in die Diversität der interindividuellen Unterschiede. Bei der Wahl von nur ein bis zwei

## 5 Diskussion

Spendertieren wären möglicherweise in den verschiedenen statistischen Auswertungen höhere Signifikanzen zu erzielen gewesen. Die Unterschiede zwischen den Spenderpopulationen wären jedoch verborgen geblieben und die Untersuchung hätte keinen Aufschluss über die in der klinischen Realität bestehenden Variationen gegeben.

Die Wahl der Spender im Alter unter 2 Jahren ermöglicht den Ausschluss eines übermäßigen Einflusses des Lebensalters auf das Proliferationsverhalten der gewonnenen Zellen und entspricht in der Regel dem Diagnosealter der Osteochondrose.

Die Untersuchungsgruppe von 20 Kadaverknien, aufgeteilt in 4 Gruppen, stellt eine für diesen Versuch ausreichend große Gruppengröße dar. Die Wahl des Körpergewichtes von mindestens 20 kg der Spendertiere führt zu vergleichbaren Geräteparametern in der MRT Untersuchung und realisiert einen direkten Vergleich der Untersuchungsergebnisse.

### 5.2.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.2.2.1 Eisennachweis: Berliner Blau Färbung

Bekannt ist für das superparamagnetische Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup>, dass es bei intravenöser Injektion von den retikuloendothelialen Zellen des Körpers (Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark) spontan angereichert wird (Hamm et al. 1994, Edelman et al. 2006). In dieser Arbeit kann zudem gezeigt werden, dass es bei einer 24 stündigen Inkubationszeit auch ohne Transfektionszusatz zu einer, für den Nachweis ausreichenden, spontanen Eisenaufnahme durch aus dem Fettgewebe gewonnene kanine Stammzellen kommt. Die Konzentration von 308 µg Fe / ml Medium (283 µl Endorem<sup>®</sup> auf 10 ml Medium) führt in der subjektiv lichtmikroskopisch ausgewerteten Berliner Blau Färbung zu einem deutlichen Eisennachweis im Zytoplasma aller Zellen. Eine durch die Markierung hervorgerufene, nachweisbare Beeinflussung der Morphologie wird durch die Untersuchung nicht nachgewiesen. Alle Zellen weisen in der lichtmikroskopischen Untersuchung eine zur negativ Kontrolle vergleichbare Morphologie auf. Diese Zellstruktur entspricht den Ausführungen der bereits veröffentlichten Publikationen über kanine mesenchymale Stammzellen (Neupane et al. 2008, Vieira et al. 2010). Die Durchführung der Färbung orientiert sich an den Standard - Protokollen des

Institutes für Veterinär – Anatomie, - Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Wie schon in der Studie von Daldrup-Link et al. (2003), Küstermann und Mitarbeitern (2007), Bulte et al. (2009), als auch in der Arbeit von Kolecka (2014) beschrieben, ist von einer spontanen Aufnahme der Dextran ummantelten Partikel durch Endozytose auszugehen. Separat hinzugefügte Transfektionsreagenzien werden für die Aufnahme in diesem Versuch nicht benötigt. Die in der Studie verwendete Eisenkonzentration und das Protokoll zur Markierung mittels Endorem<sup>®</sup> orientiert sich an der Vorstudie von Kolecka und Kollegen (2014). In dieser vorausgegangenen Studie kann anhand von ADMSCs gezeigt werden, dass es bei einer Konzentration von 448 µg SPIO / ml und 319,2 µg Fe / ml (unter Verwendung von Endorem<sup>®</sup>) zu einer vollständigen Markierung aller Zellen kommt. Die Arbeit von Kruttwig (2009), die unter anderem an embryonalen Stammzellen durchgeführt wird, spricht hingegen bei ähnlich langer Inkubationszeit (20 h - 24 h) sowohl von einer inhomogenen, als auch von einer nicht vollständigen Markierung der Kultur. Zu beachten ist jedoch die weitaus niedrigere Konzentrationen von 79,8 µg Fe / ml und 159,6 µg Fe / ml. Auch Veit und Kollegen (2011) beschreiben in ihrer Arbeit eine Abhängigkeit der Markierungseffizienz von der verwendeten Eisenkonzentration, als auch der Inkubationsdauer.

Trotz einer subjektiv wahrgenommenen, teils inhomogenen Verteilung innerhalb der Kultur kann jedoch in der hier vorgestellten Studie bei der verwendeten Konzentration von 308 µg Fe / ml eine vollständige Markierung der Zellkultur und somit eine ausreichende Markierungseffizienz nachgewiesen werden. Alle in der Berliner Blau Färbung markierten Eisenpartikel befinden sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung innerhalb des Zytoplasmas und lassen sich im MRT somit zweifelsfrei den mesenchymalen Stammzellen zuordnen.

Die verwendete Endorem<sup>®</sup> - Konzentration ist somit ausreichend, um eine vollständige Markierung der Zellen zu ermöglichen, und zeigt weiterhin in der Berliner Blau Färbung keine nachweisbaren toxischen Auswirkungen auf die Zellkultur.

### **5.2.2.2 Vitalitätstests**

#### **Phalloidin Färbung**

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Phalloidin Färbung zeigen in der subjektiven Untersuchung keine Unterschiede zwischen den Endorem<sup>®</sup>

## 5 Diskussion

markierten Stammzellen und der negativ Kontrolle. Während Thorek und Tsourkas (2008) bei höheren Eisenkonzentrationen und langer Inkubationsdauer von einem negativen Einfluss auf die Zellen berichten, können im vorliegenden Versuch subjektiv keine Auswirkungen auf die Integrität der markierten Aktinfilamente, die Morphologie der Zelle und des Kernes sowie die Morphologie des Kulturverbandes festgestellt werden. Das Aktinzytosklett zeigt bei allen Proben eine deutlich nachvollziehbare Ausprägung. Des Weiteren zeigen sich auf den Objektträgern klare Hinweise für eine vom Endorem<sup>®</sup> unbeeinflusste Proliferation in Form von Zellteilungen. Dies bestätigt ebenfalls die Studie von Daldrop-Link et al. (2003), die von einem physiologischen Einschluss des Kontrastmittels in den Eisenstoffwechsel der Zelle ausgeht und eine toxische und funktionelle Beeinträchtigung ausschließt. Ebenfalls zeigt dies die Studie von Stroh und Mitarbeitern (2006), in der widerlegt wird, dass die Aufnahme von Eisen durch oxidative Belastung zu einer nachteiligen Wirkung auf die Zellintegrität und Plastizität führt.

Die hier vorliegende Arbeit untersucht nach derzeitigem Kenntnisstand der Literatur erstmals die Möglichkeit des Nachweises der Endorem<sup>®</sup> - Partikel durch die Phasenkontrastmikroskopie. Gezeigt wird die Darstellung von Eisenkonglomeraten innerhalb der Zelle, welche bisher nur anhand von Berliner Blau Färbungen oder unter dem Elektronenmikroskop nachgewiesen wurden. Diese Methode könnte eine neue Möglichkeit zum Nachweis in Zellen inkorporierter Eisenpartikel darstellen und bedarf in Bezug auf ihre Verlässlichkeit und Ausführbarkeit weiterer Untersuchung in Folgestudien. Der Verzicht auf Färbemethoden, wie z.B. die Berliner Blau Färbung zum Nachweis der Endorem<sup>®</sup> - Partikel, zeigt sich jedoch ohne Zweifel als eine Vereinfachung der Labormethoden.

### **MTT Test**

Anhand des MTT Testes kann in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass durch die Markierung der Zellen mit dem Eisenoxidpräparat Endorem<sup>®</sup> kein nachweisbar negativer Effekt auf den Anstieg der Absorptionswerte entsteht. Da der MTT Test und die hier gemessene Absorptionzunahme über die Zeit ein Ausdruck des Zellstoffwechsels darstellen, kann von einer uneingeschränkten Lebens- und Proliferationsfähigkeit der Zellen im Vergleich zur negativ Kontrolle ausgegangen werden. Die Markierung der kaninen Stammzellen mit dem Markerstoff Endorem<sup>®</sup> in der Konzentration von 308 µg Fe / ml Medium über 24 h hat somit keine nachweisbar

## 5 Diskussion

zellschädigende Wirkung. Diese Annahme vertritt bereits die Arbeit von Kolecka (2014) bei gleicher Inkubationsdauer (24 h) und ähnlicher Eisenkonzentration (319,2  $\mu\text{g Fe / ml}$ ). Jedoch werden in der Studie von Kolecka und Mitarbeitern rein exemplarisch die Auswirkungen der Markierung anhand zweier untersuchter Hunde Stammzellpopulationen zu lediglich 2 Messzeitpunkten (24 h und 48 h nach der Markierung) dargestellt. Mit der Wahl einer größeren Versuchsgruppe (5 Spendertieren) und einer Steigerung der Messzeitpunkte (Tag 0, 1, 2, 3 nach der Markierung) kann dieses vorläufige Ergebnis nun signifikant bestätigt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Frank und Mitarbeiter (2003) bei der Untersuchung von humanen Stammzellen, die mit dem Produkt Feridex<sup>®</sup> markiert wurden. Auch in der Studie von Arbab und Mitarbeitern (2011) kommt es sowohl an humanen Stammzellen als auch an anderen Zelllinien zu keinem nachweisbar negativen Effekt der Endorem<sup>®</sup>- Protaminsulfatmarkierung (Fe 100  $\mu\text{g/ml}$  über 12 h). Veit und Mitarbeiter (2011) beschreiben sowohl für das Schaf als auch das Pferd ähnliche Ergebnisse. Lediglich Soenen und Mitarbeiter können (2010) bei sehr hoher Endorem<sup>®</sup> - Konzentration (Fe 600  $\mu\text{g/ml}$ ) eine negative Auswirkung und Verlängerung der Zellverdopplungszeit feststellen. Zu erklären ist diese proliferationshemmende Wirkung am wahrscheinlichsten durch die im Versuch fast doppelt so hoch gewählte Eisenkonzentration.

Der MTT Test stellt eine gut etablierte Untersuchungsmethode zur Analyse der Proliferationskapazität und Beeinflussung der Zellvitalität durch Markierungssubstanzen dar (Bernsen et al. 2009, Shell et al. 2012, Goergen et al. 2014). Die Durchführung des Tests orientiert sich in allen Abläufen an den Standardprotokollen des Institutes für Veterinär -Anatomie, -Histologie und Embryologie der Universität Gießen. Obwohl die Expansion einer Zellkultur am zuverlässigsten anhand einer Exponentialfunktion dargestellt wird, zeigen die aus den Messergebnissen gebildeten Regressionsgeraden hohe Determinationskoeffizienten  $r^2$ . Diese beweisen in erster Näherung eine sehr gute Approximation der gebildeten Regressionsgeraden an die Exponentialfunktion. Somit ist es möglich, die Proliferationskapazität der Zellpopulationen anhand ihrer Steigungen  $m$  zu vergleichen, Variationen in der Anfangszellzahl zu vernachlässigen und Schlüsse über potentiell negative Auswirkungen auf die Vitalität der Zellkultur zu ziehen. Alle Versuche werden unter stets gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt, so dass die von Bernsen und Mitarbeitern (2009) beschriebenen

## 5 Diskussion

Variationen im Metabolismus der Mitochondrien weitestgehend ausgeschlossen werden können. Obwohl es zu vergleichbaren Ergebnissen zwischen den markierten und den unmarkierten Zellen eines Spendertieres kommt, kann in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Kulturen beobachtet werden. Auch in anderen Studien kommt es bei der Verwendung mesenchymaler Stammzellen bereits zu starken Variationen in der Proliferationskapazität unterschiedlicher Spenderpopulationen (Moroni u. Fornasari 2012, Goergen et al. 2014). Um einen Effekt des Alters auf die Proliferationskapazität, der bereits von Stenderup und Kollegen (2003) und anhand kaniner Stammzellen von Volk und Mitarbeitern (2012) nachgewiesen werden kann, auszuschließen, werden in der hier vorgestellten Arbeit nur Proben von Tieren unter 2 Jahren verwendet. Anhand der Testergebnisse zeigt sich jedoch, dass auch in dieser Gruppe interindividuelle Unterschiede im MTT Ergebnis eine weitaus höhere Relevanz haben als mögliche Auswirkungen der Endorem<sup>®</sup> - Markierung (Konzentration 308 µg/ml über 24 h). In Frage kommende Ursachen hierfür sind Differenzen im Metabolismus der verwendeten Spender zum Zeitpunkt der Zellentnahme, interindividuelle Eigenheiten der Zelleigenschaften oder minimale zeitliche Abweichungen in der Laborisation. Auch wenn alle Proben innerhalb von 24 h weiterverarbeitet werden, stets die gleiche Zellpassage und das selbe Medium verwendet wird, ist es dennoch möglich, dass zeitliche Abweichungen im Laborprozess zu Unterschieden in der Proliferationskapazität führen (Kühn u. Kühn 2012).

Volk und Mitarbeiter (2012) beschreiben anhand kaniner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark signifikante Auswirkungen von Alter und Entnahmestelle auf das Proliferations - und Koloniebildungsverhalten, sowie die Teleomerlänge der untersuchten Zellkulturen. Auf Grund der geringen Stichprobe von insgesamt 18 Hunden und einer unterschiedlichen Verteilung männlicher und weiblicher Tiere innerhalb der Stichprobe kann die Untersuchung von Volk und Mitarbeitern (2012) objektiv betrachtet jedoch nur einen Trend in der Proliferation wiedergeben. Bei der Studienplanung der vorliegenden Arbeit wird dieser mögliche Einfluss jedoch trotzdem berücksichtigt. Es werden nur Spender unter 2 Jahren ausgewählt. Eine Variation auf Grund der Herkunft der Zellen kann auf Grund der identischen Entnahme ebenfalls ausgeschlossen werden.

Weitaus bedeutender für die hier durchgeführte Studie erscheinen die Erkenntnisse aus der Studie um Bertolo und Mitarbeitern (2015). Sie zeigen Unterschiede in der

## 5 Diskussion

Proliferation, der Koloniegröße, der Differenzierungskapazität und der Telomerlänge mesenchymaler Stammzellen bei verschiedenen Hunderassen auf. Eine eingeschränkte Auswertbarkeit besteht jedoch auch bei dieser Studie, da hier ebenfalls die Versuchsgruppen der sechs getesteten Hunderassen aus lediglich 3 Tieren pro Rasse bestehen. Des Weiteren werden männliche und weibliche Tiere in den Kleingruppen gemischt betrachtet, es bestehen deutliche Altersunterschiede zwischen den untersuchten Rassen und in den Vergleich fließen lediglich Werte von großen Hunderassen mit ein. Lässt man diese Einschränkungen außer Acht, könnten die in der Studie um Bertolo (2015) gefundenen rassespezifischen Unterschiede jedoch einen deutlichen Einfluss auf die in der hier vorliegenden Studie gefundenen Proliferationswerte haben. Die in der Studie verwendeten fünf Spendertiere gehören sowohl kleinen, als auch großen Hunderassen, bzw. Mischlingstieren an. Sollte die Rasse einen deutlichen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zellen haben, könnte dies eine Ursache für die erhobenen Daten sein. Im Mittelpunkt humaner Untersuchungen stehen neben dem Alter auch der Einfluss des Spendergeschlechtes auf die Proliferationsraten, die Differenzierbarkeit, Oberflächenmoleküle, Telomerase Aktivität und weitere Eigenschaften von Stammzellen. Anhand von humanen Stammzellen können Siegel und Mitarbeiter (2013) neben den bereits erwähnten Altersunterschieden deutliche Geschlechterunterschiede bei den Zelleigenschaften ausmachen. Auch dies kann einen beeinflussenden Faktor in der hier beschriebenen Studie darstellen. Bei den fünf verwendeten Spendertieren sind sowohl Zellen von weiblichen, als auch männlichen Hunden entnommen.

Insgesamt muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass all diese Differenzen bei der Untersuchung auf die Endorem® - Auswirkungen keinen Effekt auf den interindividuellen Vergleich zwischen Endorem® markierten Zellen und nicht markierten Zellen eines Spenders haben. In der Untersuchung werden stets die Zellen eines Individuums miteinander verglichen und ausgewertet, so dass Differenzen zu anderen Spendertieren, wenn auch auffällig, aber nebensächlich sind. Für den klinischen Einsatz von Stammzellen ist es hingegen entscheidend zu wissen, dass es trotz vergleichbarer Kriterien zu massiven Unterschieden in den Wachstumsraten der verschiedenen Spender kommen kann und dieses bei dem therapeutischen Einsatz berücksichtigt werden muss.

Weitere Untersuchungen zu diesem Thema sind deshalb dringend anzuraten.

### Life Cell Imaging

In der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich zu den Einflüssen auf die Proliferation und Apoptose der Einfluss der Endorem<sup>®</sup> - Markierung auf die Migrationsfähigkeit der Zellen getestet. Anhand der gemessenen Besiedlungszeit von Endorem<sup>®</sup> markierten und nicht markierten Zellen derselben Zellpopulation im Culture - Insert kann eine Aussage über die Beeinflussung der Migrationsfähigkeit getroffen werden. Innerhalb dieses Versuches zeigen sich keine Unterschiede zwischen den mit Endorem<sup>®</sup> behandelten Zellen und der negativ Kontrolle. Somit stellt auch das Verfahren des Life Cell Imaging einen Beweis für die biologische Unschädlichkeit der im Versuch durchgeführten Endorem<sup>®</sup> - Markierung auf die kanine Stammzellkultur dar. Die Vorgehensweise der Messung und statistischen Auswertung orientiert sich an den Vorgaben der *Application note 30* der Firma Ibidi GmbH. Die hohen Determinationskoeffizienten  $r^2$  der aus den Mittelwerten gebildeten Regressionsgeraden beweisen eine gute Approximation der gemessenen Werte an die lineare Wachstumsphase. Die Zellen aller 5 Hunde zeigen mit und ohne Eisenoxid - Markierung ein schnelles Einwandern in das artifizielle Wundgebiet und einen zeitnahen Verschluss des zellfreien Raumes. Wie schon im MTT Test fallen auch hier interindividuelle Unterschiede zwischen den Zellpopulationen auf. Der Zusammenhang zwischen der jeweiligen Stammzellpopulation und den gemessenen Werten lässt sich hier jedoch im T – Varianztest auf Grund der geringen Probenzahl nur tendenziell nachweisen. Der Pearson Korrelationstest für geringe Stichprobengrößen beweist hingegen eine eindeutige Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der verwendeten Zellpopulation. Zu beachten ist jedoch, dass keine Korrelation zwischen den Ergebnissen des MTT Tests und des Life Cell Imaging besteht. Dementsprechend ist es möglich, dass die Proliferationskapazität kein entscheidendes Kriterium bei der Besiedlung der freien Fläche im Life Cell Imaging darstellt. Ähnliche Erfahrungen macht bereits die Arbeitsgruppe von Reich und Mitarbeitern (2012), die sich mit dem Vergleich von mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe des Hundes befasst. Auch hier weisen die proliferationsstarken ADMSCs tendenziell, jedoch statistisch nicht nachweisbar, einen etwas langsameren Wundverschluss im Vergleich zu den proliferationschwächeren aus dem Knochenmark stammenden Zellen auf.

## 5 Diskussion

Die Methode des Life Cell Imaging in Form eines Scratch Assays (Wundheilungsassay) ist mit Hilfe des Culture - Insert Systems der Firma *Ibidi* ein äußerst präzises Verfahren, welches bereits in vielen Studien Verwendung findet (Liang et al. 2007, Veitinger und Jiang 2012, Goergen et al. 2014). Trotz einer scheinbar standardisierten freien Fläche durch das Culture Insert kommt es im vorliegenden Versuch zu Abweichungen in den Messungen zum Zeitpunkt 0. Mögliche Ursachen hierfür können produktionsbedingte Ungleichheiten im Silikon Inlett oder Verformungen bei der Anheftung an die Petrischale darstellen. Unter Berücksichtigung der prozentual bewachsenen Fläche kann diese Fehlerquelle in der vorliegenden Auswertung jedoch sicher ausgeschlossen werden.

Eine Untersuchung der Beeinträchtigung der Differenzierbarkeit der Zellen nach Endorem<sup>®</sup> - Markierung wird in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Geht man davon aus, dass nicht nur parakrine Faktoren der MSCs, sondern ebenfalls eine Differenzierung in Chondrozyten eine entscheidenden Rolle bei der Abheilung von Knorpeldefekten spielen, ist dies im Weiteren gesondert zu betrachten.

Über diese mögliche Beeinträchtigung der chondrogenen Differenzierbarkeit durch eine Zellmarkierung liegen bisher konträre Meinungen vor. Kolecka (2014) beschreibt in ihrer Arbeit eine geringe Beeinträchtigung der chondrogenen Differenzierbarkeit der Zellen nach Markierung mit Endorem<sup>®</sup>. Ähnliche Ergebnisse erhalten auch Kostura et al. (2004) und Bulte et al. (2004) bei sehr hohen, die verwendete Menge übersteigenden, Eisenkonzentrationen. In der Studie von Kostura (2004) ist zudem hinzuzufügen, dass in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Endorem<sup>®</sup> - Markierung ein zusätzliches Transfektionsmittel (Poly L Lysin) verwendet wird, welches in der Kombination die chondrogene Differenzierung ebenfalls beeinträchtigen kann. Die Studie von Farrell et al. (2008) hingegen beschreibt eine spontane chondrogene Differenzierung von Eisenoxid markierten MSCs nach subkutaner Transplantation in einem Scaffold und kommt wie auch Arbab et al. (2004) zu dem Schluss, dass Endorem<sup>®</sup> keinen negativen Einfluss auf die Differenzierung ausübt. Auch Veit und Mitarbeiter (2011) erhalten gute chondrogene Differenzierungsergebnisse nach Endorem<sup>®</sup> - Markierung von Schaf - und Pferdestammzellen, schließen jedoch eine Auswirkung der Höhe des Eisengehaltes auf die Differenzierbarkeit nicht endgültig aus. Zum Zeitpunkt der Untersuchung liegen in der Literatur keine bekannten Ergebnisse über die Beeinträchtigung der

Sekretionsfähigkeit von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung vor. Es ist jedoch zu beachten, dass diese beiden Faktoren der Endorem<sup>®</sup> - Wirkung einen entscheidenden Einfluss für die klinische Einsetzbarkeit bei Knorpeldefekten hätten. Auch wenn die bisherigen Ergebnisse der durchgeführten Arbeit nicht auf eine negative Beeinflussung des Zellstoffwechsels hindeuten, scheinen Folgestudien in diesem Bereich unerlässlich.

### 5.2.2.3 Elektronenmikroskopie

Küstermann und Mitarbeiter beschreiben (2008) bereits die spontane Aufnahme von Endorem<sup>®</sup> - Partikeln durch Endozytose. Dies wird ebenfalls durch die Studie von Kolecka (2014) für kanine ADMSCs bestätigt. Auch in der vorliegenden Studie kann ultrastrukturell mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskopes die Aufnahme der Endorem<sup>®</sup> - Partikel in das Zytoplasma der Zellen bewiesen werden. Im Vergleich zu der Studie von Kolecka und Mitarbeitern (2014) zeigen sich die Partikel schon kurz nach der Markierung sowohl frei im Zytoplasma, in Form von Clustern, als auch gebunden in Lysosomen und Residualkörpern. Ein zeitlicher Zusammenhang zum Einlagerungsort in der Zelle kann somit anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Kolecka und Mitarbeiter (2014) beschreiben in ihrer Arbeit eine vermehrte Einlagerung der Partikel in den Lysosomen im zeitlichen Abstand von ca. drei Wochen nach der Markierung und eine freie Einlagerung der Partikel im Zeitraum von ein bis zwei Wochen nach der Markierung. Sykova und Jendelova (2006) beschreiben lediglich die Einlagerung der Endorem<sup>®</sup> - Partikel als Cluster im Zytoplasma. In der Arbeit von Küstermann und Mitarbeitern (2008) wird zudem eine Bindung der Eisenpartikel an die äußere Zellmembran beschrieben. Diese Anlagerung erklärt sich im Sinne der Aufnahme der Partikel über die Endozytose. In der hier präsentierten Studie werden die untersuchten Zellen jedoch nach der Markierung mehrfach mit Standard – Zellkulturmedium und PBS Pufferlösung gewaschen und für die Färbung und mikroskopische Untersuchung lysiert und auf andere Kulturplatten (Chamberslides) überführt. Dieser Vorgang trägt höchstwahrscheinlich dazu bei, dass in der anschließenden TEM Untersuchung keine Partikel im äußeren Bereich der Zellmembran aufzufinden sind.

Kraitchman et al. (2008) vertreten die These, dass anhand der MRT Ergebnisse letztlich nur die SPIO Partikel *in vivo* verfolgbar sind, diese Methode zwar somit eine hohe Spezifität für die Partikel, jedoch nicht selektiv für die mesenchymalen

Stammzellen aufweist. Begründet wird dies in dem magnetresonanztomographischen Nachweis von freien, nicht vollständig aufgenommenen Eisenpartikeln. Da jedoch im vorliegenden Versuch die SPIO Partikel nach den beschriebenen Wasch - und Passagiervorgängen sowohl in der TEM Untersuchung als auch in der Berliner Blau Färbung nur innerhalb der intakten Zelle nachgewiesen werden können, ist mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine Messung von extrazellulärem Eisen im MRT auszuschließen. Die in der MRT nachgewiesenen Eisenpartikel können anhand dieser Untersuchungen somit mit einer hohen Spezifität den eingebrachten Zellen zugeordnet werden.

### 5.2.2.4 MRT Messung

Die Ergebnisse der MRT Untersuchung beweisen die Möglichkeit eines *in - vivo* Nachweises von mit Endorem<sup>®</sup> markierte mesenchymale Stammzellen in Kombination mit einem Kollagengel in einem Knorpeldefekt am Kniegelenk des Hundes. Bei der Auswertung der Messergebnisse müssen jedoch zahlreiche äußere Einflüsse berücksichtigt werden, um häufig vorkommende Fehlerquellen auszuschließen.

Laut der Versuchshypothese sollte es mit steigender Zellkonzentration im Knorpeldefekt des Femurkondylus zu einer detektierbaren Abschwächung des MRT Signales in diesem Bereich kommen. Durch die zytoplasmatisch eingelagerten Eisenpartikel kommt es in der T2\*- gewichteten (FFE) – (Schichtdicke 2 mm) Sequenz zu einer Inhomogenität des Magnetfeldes, einer Phasenverschiebung der umliegenden Protonen und einer daraus resultierenden Abschwächung des Signals (Reiser und Semmler 2002, Edelman et al. 2006). Somit besteht im Vorfeld der Studie die Hypothese, dass die gemessene Signalintensität in einen direkt invers proportionalen Zusammenhang zur eingesetzten Zellmenge gebracht werden kann. Bereits in anderen Studien zeigt sich die eingesetzte T2\*- gewichteten (FFE) – Sequenz als das Mittel der Wahl für die Darstellung und Quantifizierung von mit Eisenpartikeln markierten Zellen (Ittrich et al. 2005, Küstermann et al. 2008, Nohroudi et al. 2010, Kolecka et al. 2014). In allen Sequenzen der hier vorliegenden Studie ist der artifiziell gesetzte Knorpeldefekt eindeutig zu identifizieren. Speziell in den T2\* - und Protonendichte - gewichten Sequenzen ist eine gute Abgrenzung des Defektes gegenüber der Knorpeloberfläche und der umgebenden Strukturen möglich. Die Wahl des Zwei - Komponenten Kollagengels dient in diesem Fall nicht

## 5 Diskussion

nur der Adhäsion der Zellen an den Defektbereich sondern wirkt sich als Trägermaterial der Stammzellen durch seine hyperintensiven Eigenschaften im MRT positiv auf den Kontrast aus. Andere Studien haben gezeigt, dass eine Identifizierung der markierten Zellen durch hypointense Umgebungsstrukturen, wie beispielsweise Sehnen und Faszien, erschwert werden kann (Li et al. 2011), so dass die hier verwendete Kombination eine ideale Untersuchungsform darstellt.

In der objektiven Messung wird die sogenannte „*Region of Interest*“ vom Untersucher so platziert, dass sie den mit Kollagen und Zellen gefüllten Defekt möglichst weiträumig abdeckt. Bei der Auswertung der objektiv gemessenen Daten muss jedoch insgesamt von einem zu hohen Einfluss der größtenteils sichtbaren Fehlerquellen durch Luftpneumothorax, unvollständige Defektfüllung mit Eindringen von hyperintenser Kochsalzlösung und schlechter Abgrenzbarkeit zum Knochen (vorwiegend proximal) ausgegangen werden.

Auf Grund der starken Beeinflussung durch diese klar zu identifizierenden Fehlerquellen kommt es in der objektiven MRT Messung bei allen Konzentrationen zu einer massiven Streuung der gemessenen Signalintensitäten. Bei der Interpretation der Ergebnisse fällt auf, dass der standardisierte Mittelwert von der Konzentration 0 Zellen pro ml mit 65,33 scheinbar höher liegt als der Mittelwert von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro ml mit 46,83. Dies könnte laut der Hypothese einer verminderten Signalintensität durch die Endorempartikel entsprechen. Jedoch liegt der Mittelwert für  $4,75 \times 10^5$  Zellen pro ml mit 67,13 geringfügig höher als der 0 Wert. Der Mittelwert der Signalintensitätsmessung für  $10 \times 10^5$  Zellen pro ml sollte laut Hypothese den geringsten Wert aufweisen. Er liegt zwar unter dem 0 Zellen pro ml Wert jedoch oberhalb der zweitniedrigsten Zellkonzentration und gibt somit keinen Aufschluss über die enthaltene Zellmenge. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch in der statistischen Auswertung, in der kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Signalintensität und dem Zellgehalt nachgewiesen werden kann.

Speziell der Einfluss von Luftbläschen im eingesetzten Kollagen gel führt in über 50 % der Fälle zu einer starken Beeinträchtigung der Messergebnisse. Schon Küstermann und Mitarbeiter (2008) beschreiben den negativen Einfluss von eingedrungenen Luftbläschen bei der Messung in einem Agarosegelphantom. Auch Kolecka und Kollegen (2014) bemerken den nachteiligen Einfluss von Luftbläschen bei der MRT Messung von Hundestammzellen im Gelphantom bei einem 1 Tesla Tomographen. Luft ist in der magnetresonanztomographischen Bildgebung wie auch

## 5 Diskussion

die superparamagnetischen Stoffe (z.B. Endorem<sup>®</sup>) als Negativkontrastmittel bekannt und führt durch seine Verkürzung der T2 - Relaxationszeit zu einer Abschwächung des erzeugten T2 - Signales (Chambon et al. 1993, Edelman et al. 2006).

In der vorliegenden Kadaverstudie stellt jedoch nicht wie bereits beschrieben das umgebende Gelphantom, sondern die Kollagengel Matrix, in die die markierten Stammzellen bei der Implantation eingebettet sind, das maßgebliche Problem dar. Trotz strenger Einhaltung der Gebrauchsanleitung und zahlreichen Wiederholungen der Befüllung der Injektionsspritzen kann ein Eindringen von Luft in das endgültige Implantat nur schwer verhindert werden. Speziell bei der Vermischung der zwei Komponenten im mitgelieferten Single Use Adapter<sup>®</sup> und Single Use Mixer<sup>®</sup> kommt es trotz Verwerfen der ersten Tropfen und sehr langsamer Applikation zu einer Beimischung von Luftblasen. Nach Angaben der Firma Amedrix lassen sich diese Lufteinschlüsse durch die oben genannten Vorkehrungen vermeiden. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass gegebenenfalls auftretende minimale Gaseinschlüsse schon nach kurzer Zeit vom Empfängerorganismus resorbiert würden und somit keinen nachteiligen Effekt für den weiteren Heilungsverlauf darstellen. Dies könnte sich bei einem klinischen Einsatz der verwendeten Methode positiv auf die Messergebnisse auswirken und eine deutlich verbesserte Auswertung im MRT möglich machen. Derzeit stellt die im Implantat eingeschlossene Luft jedoch in der durchgeführten Kadaverstudie, speziell in dem Versuch einer objektiven Datenerfassung, ein entscheidendes Problem dar.

Durch anschließendes Spülen des Gelenkes mit isotonischer Kochsalzlösung ist es in der Versuchsdurchführung gelungen, eine negative Beeinflussung der Messdaten durch freie intraartikuläre Gaseinschlüsse, die durch die Eröffnung des Gelenkes verursacht werden, weitestgehend zu verhindern. Luftblasen innerhalb des intraartikulären Raumes beeinträchtigen bei keiner Messung die MRT Auswertung.

Die intensive Gelenkspülung führt jedoch höchstwahrscheinlich bei zwei der zwanzig Knie zu einer im MRT deutlich sichtbaren, unvollständigen Defektfüllung durch das Kollagengel. Die hyperintense Spülflüssigkeit kann bei diesen Präparaten subjektiv durch den Betrachter auch innerhalb des Knorpeldefektes nachgewiesen werden. Da bei allen Knien zum Zeitpunkt des Wundverschlusses eine vollständige Defektfüllung vorliegt, erscheint das Ausspülen des Kollagengels durch die anschließende intensive Gelenkspülung als am wahrscheinlichsten. Mögliche Ursachen sind hierfür die Ausrichtung der zur Spülung gesetzten Kanülen, die damit einhergehende

## 5 Diskussion

Manipulation des Gelenkes oder die nicht vollständige Aushärtung des Gelimplantates bei Verschluss des Kniegelenkes. In der objektiven Auswertung kann es in diesem Bereich der ROI somit zu einer fälschlich hohen Signalintensitätsmessung kommen. Das durch die Endorem<sup>®</sup> markierten Zellen verursachte hypointense Signal wird durch die eingedrungene hyperintense Spüfflüssigkeit überlagert und fehlinterpretiert.

Des Weiteren zeigt sich bei der Begutachtung der T2\* - gewichteten (FFE) – (Schichtdicke 2 mm) Aufnahmen ein Signalverlust des Knochens am Grund des mit dem Bohrer gesetzten Defektes. Dieser signalarme Knochenbereich erschwert in der objektiven Auswertung die exakte Abgrenzung der proximalen Defektränder und stellt eine weitere mögliche Ursache für die hohe Varianz der Messergebnisse dar. Auf Grund des fälschlichen Miteinbeziehens dieses Bereiches ist es möglich, dass es zu einer irreführend niedrigen Signalintensität in der Messung kommt. Für den Signalverlust innerhalb des Knochens kommt als mögliche Ursache die Durchführung der Bohrung in Frage. Durch die mechanische und thermische Manipulation wird unterhalb und in seltenen Fällen auch seitlich des artifizialen Defektes eine im MRT hypointens dargestellte Knochenstruktur erzeugt. In Frage kommen hier beispielsweise eine Knochennekrose in Form einer Myelosklerose.

Ähnliche Befunde können auch in seltenen Fällen im klinischen Alltag postoperativ nach Knochenbohrungen beobachtet werden (Fossum 2007, Tobias u. Johnston 2012). Während die Knochennekrose auf Grund der Ödembildung in der klinischen Literatur als hyperintense Struktur beschrieben wird (Rummeny et al. 2002), stellt sich der veränderte Bereich in der vorliegenden kadaver Studie hingegen hypointens dar. Erklärt werden kann dies durch die ausbleibende Ödembildung des Kadavers. Eine Vermeidung dieser Artefakte kann in der Verwendung anderer Bohrinstrumente, einer effektiveren Kühlung während des Bohrprozesses und einer langsameren Drehzahl gesehen werden (Fossum 2007).

Die objektive ROI Messung wird im Rahmen der Studie an verschiedenen weiteren MRT Sequenzen durchgeführt. Die Analyse der Messergebnisse zeigt hier deutliche Unterschiede in den Signalintensitäten der Defektmessung. Diese sind begründet in den verschiedenen Eigenschaften und Empfindlichkeiten der angewandten Sequenzen, können jedoch ebenfalls sowohl graphisch als auch statistisch nicht in einen Zusammenhang mit der steigenden Endorem<sup>®</sup> - Konzentration im Defekt

## 5 Diskussion

gebracht werden und werden somit in der weiteren Betrachtung vernachlässigt (siehe Anhang 9.2.3).

In der subjektiven Datenerfassung der T2\*- gewichteten (FFE) – (Schichtdicke 2 mm) Sequenz besteht das Ziel, die oben genannten Fehlerquellen weitestgehend durch eine vom Untersucher frei gewählte ROI von der Messung auszuschließen. Es gelingt durch eine möglichst präzise und subjektiv erstellte ROI und eine explizite Aussparung der beschriebenen und eindeutig zu identifizierenden Artefakte, fälschliche und irreführende Messergebnisse zu vermeiden. Die eingeschränkte Spezifität der Methode, welche durch das identische Signal von Luft begründet ist, kann somit erhöht werden. Die Messung erfolgt bei dieser Methode ausschließlich in einem definitiv vom Gel ausgefüllten Bereich. Deutlich vom Untersucher in der T2\* - gewichteten (FFE) oder anderen Sequenzen zu erkennende Luftblasen werden von der Signalintensitätsmessung ausgeschlossen. Ebenso wird der Defekt unter Zuhilfenahme der Protonendichte gewichteten Aufnahmen und der transversalen 3D WATS Aufnahmen noch klarer und enger definiert, so dass es nicht zu Verfälschungen der Messungen durch Miteinbeziehens des Außenbereichs kommt. Es bestätigt sich, dass unter Berücksichtigung dieser Tatsachen nicht nur ein eindeutiger magnetresonanztomographischer Nachweis Endorem® markierter Stammzellen in einem Knorpeldefekt möglich ist, sondern auch eine inverse Korrelation zwischen der Signalintensitäten und der eingebrachten Zellmenge besteht ( $p = 0,016$ ). Saldanha und Mitarbeiter (2008) beschreiben für humane Stammzellen in ihrer *in vitro* Studie ebenfalls einen Zusammenhang zwischen markierter Zellmenge und resultierender T2\* Signalauslöschung in der MRT Untersuchung. Da nach Koga et al. (2008) die eingebrachte Zellmenge einen wesentlichen Einfluss auf das Resultat der Therapie hat, wäre es mit dieser Methode theoretisch möglich, den Verlauf der Zellkonzentration nach Implantation zu kontrollieren und die für die einen therapeutischen Effekt wichtige Ortsgebundenheit der Zellen zu überprüfen (Lopez-Laguna et al. 2011). Kritisch betrachtet werden muss hingegen die geringfügige Überschneidung der Varianzen in den gemessenen Daten. Da es sich bei einem 1 Tesla Magnetresonanztomographen um ein derzeit noch üblicherweise in der Tiermedizin verwendetes Gerät handelt, ist zu bedenken, dass modernere Geräte mit höheren Feldstärken und höherer Auflösung zu präziseren Messergebnissen führen können. Speziell in der Humanmedizin werden

## 5 Diskussion

bereits erfolgreiche Zelltrackingstudien an Geräten mit deutlich stärkeren Magnetfeldern durchgeführt (Bulte et al. 2009). Auch in der Tiermedizin wird es in den nächsten Jahren zu einem weiteren technischen Fortschritt in diesem Bereich kommen, so dass Untersuchungen mit höherer Feldstärke möglich sein werden. Die gewonnenen Studienergebnisse beweisen jedoch, dass auch ein 1 Tesla Tomograph im klinischen Einsatz unter Berücksichtigung von gewissen Einschränkungen in der Lage ist, einen invers proportionalen Zusammenhang zwischen markierter Zellkonzentration und T2 - Relaxationszeit wiederzugeben. Dies entspricht auch bereits bekannten Studien, in denen beispielsweise Norman und Mitarbeiter (1992) es schaffen, mit einer weitaus geringeren Feldstärke von 0,14 Tesla, mit Eisenpartikeln markierte Zellen sicher vom Empfängergewebe (Ratte) zu unterscheiden. Eine Zuordnung der Messwerte zur eingebrachten Zellmenge ist jedoch in Studien mit derart geringer Feldstärke nicht möglich.

In der vorliegenden Studie kann statistisch signifikant gezeigt werden, dass sich das Signal mit steigender Zellmenge verändert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die vom Untersucher nicht erkannten Artefakte, wie beispielsweise kleinste Luftkontaminationen, dieses Signal weiterhin beeinflussen und gegebenenfalls zu einer Überschneidung der Messwerte beitragen.

Entscheidender Vorteil der nicht invasiven MRT Untersuchung ist die zudem in Schnittbildern aller drei Ebenen mögliche Analyse der Zellen im anatomischen Zusammenhang.

Die Einflüsse durch die untersuchende Person sind bei dieser subjektiven Auswertung als hoch anzusehen. Die Messungen erfolgen jedoch anhand eines stets gleichen MRT – Untersuchungsprotokolls. Auf Grund der identisch gewählten Frequenzparameter für alle Messungen lassen sich technische Einflüsse somit auf ein Minimum reduzieren und die Daten sind als vergleichbar zu beurteilen.

Wie auch schon in der Studie von Kolecka und Mitarbeitern (2014), als auch in der Studie von Küstermann et al. (2008) ist zu diskutieren, in wie weit die in der TEM Untersuchung nachgewiesene zytoplasmatische Verteilung und die Menge der eingelagerten Endorem® - Partikel einen weiteren Einfluss auf das MRT Signal haben können. In den Aufnahmen des Elektronenmikroskops konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Ablagerungsformen in der Zelle vorkommen. Somit könnten sich intrazellulär gebildete Eisenkonglomerate anders auf das Signal auswirken als diffus verteilte Partikel (Küstermann et al. 2008). Fraglich ist des Weiteren, ab

welchem intrazytoplasmatischen Grenzwert eine Zelle zu einer detektierbaren Signalauslöschung führt. Nach Hermann (1998) geht man davon aus, dass sich niedrigen Konzentrationen von T2 - Kontrastmitteln umgekehrt proportional zum T2 - Signal verhalten, während sich bei höheren Konzentrationen ein negativ logarithmischer Zusammenhang ergibt. Während von manchen Autoren eine kurze Halbwertszeit der Eisenoxidpartikel in den Zellen diskutiert wird, beweist die Arbeitsgruppe um Kolecka (2014) bereits vor Erstellung dieser Studie in ihrer *in vitro* Untersuchung an kaninen ADMSCs, dass es auch 21 Tage nach einer Markierung noch möglich ist, Zellen in einem 1 Tesla Gerät zu detektieren. Anhand eines 4,7 Tesla Spektrometers gelingt es Sykova und Jendelova (2006) *in vivo* Endorem<sup>®</sup> markierte Stammzellen erfolgreich über 30 Tage zu verfolgen. Roth und Mitarbeiter (2009) können markierte mesenchymale Stammzellen in einem 7 Tesla Gerät über 6 Wochen nach lokaler Transplantation innerhalb eines Skelettmuskeltrauma der Ratte nachweisen.

Bei Hunden wird *in vivo* lediglich ein Darstellungszeitraum von 8 Tagen in der Niere nach intravenöser Injektion des Präparates Resovist<sup>®</sup> beschrieben (Kedziorek und Kraitchmann 2010). Veit und Mitarbeiter (2011) diskutieren jedoch eine längere Nachweisbarkeit von *in vivo* gegenüber *in vitro* Zellen. Auf Grund von einer optimalen Umgebung und Nährstoffzusammensetzung ist es ihrer Meinung nach möglich, dass die Proliferation der MSCs *in vivo* deutlich langsamer verläuft und somit einer Verdünnung des Kontrastmittels durch Aufteilung auf Tochterzellen entgegenwirkt. In wie weit diese Zahlen auch für die Nachweisbarkeit von Zellen in einem Gelenkdefekt gelten, werden zukünftige Untersuchungen zeigen müssen. Basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten Kadaverstudie ist es nun möglich, eine klinische Studie zur Nachweisbarkeit von markierten Stammzellen innerhalb eines Gelenkdefektes zu planen und weitere Ergebnisse zum Verbleib und Wirkmechanismus der Zellen zu erhalten.

### 5.2.2.5 Ergänzende Untersuchungen

#### Kompatibilität Zellen / Matrix

#### Zellauswanderung aus Gelpellet im Life Cell Imaging

Die Ergebnisse der Studie zeigen eine gute Kompatibilität der ADMSCs des Hundes mit dem verwendeten Zwei - Komponenten Kollagengel der Firma Amedrix. Die Kollagenmatrix bietet den Zellen eine optimale Umgebung für das Wachstum und die

## 5 Diskussion

Proliferation. Das Gel ermöglicht den Zellen zusätzlich einen Austritt in die angrenzenden Bereiche und hat keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität. Auf ähnliche Ergebnisse verweist die Firma Amedrix in der Untersuchung von humanen Zellen als auch die Studie von Guth und Kollegen (2013), in der die Kompatibilität eines Kollagen I Gels (Firma Amedrix) mit equinen ADMSC getestet wurde. Wie auch anhand der Hundezellen nachgewiesen, kann in den vorhergehenden Studien ein Auswandern der Zellen aus dem Gel beobachtet werden. Die Arbeit von Guth und Kollegen (2013) beweist dies mit einer Kontrolle von Gelfragmenten, die nach dem 1., 5., 7., 9., und 14. Tag nach Kultivierung abgetrennt und dann mikroskopisch auf ein Auswandern der equinen Zellen untersucht werden. Des Weiteren beschreiben Guth und Kollegen (2013) ebenfalls eine stetige Zunahme der equinen Zellzahl innerhalb des Gels anhand einer Trypan Blau Färbung, welches sich trotz der Verwendung eines geringfügig unterschiedlichen Präparates, mit den Ergebnissen des Life Cell Imaging dieser Arbeit deckt.

Auf Grund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass das verwendete Kollagengel beim Menschen bereits zellfrei eingesetzt wird, können die von O'Grady (2003) beschriebenen Zweifel, wie insuffiziente Zellmigration innerhalb des Gels, entzündliche Reaktionen auf das Material und das Fehlen von Zellkontakten, widerlegt werden.

Der Wirkmechanismus von mesenchymalen Stammzellen bei der Wundheilung von Gewebedefekten und im Speziellen bei der Regeneration von Knorpel ist noch nicht eindeutig geklärt und bedarf weiterer grundlegender Forschung. Die Studien von Yanai et al. (2005), in der mesenchymale Stammzellen in einem Kollagengel in einen großen „full thickness“ Knorpeldefekt im Tibia Plateau beim Hasen eingebracht werden, zeigen jedoch vielversprechend eine Hyalin - ähnliche Knorpeloberfläche mit deutlich verbesserter Matrixmorphologie gegenüber der alleinigen Gel Behandlung (12 Wochen post Op). Chiang et al. (2005) erhält 6 Monate nach Implantation ähnliche Ergebnisse in einer Untersuchung an Schweinen. Auch Jung und Kollegen (2009) beschreiben für einen Versuch an Minipigs eine deutlich verbesserte Heilung eines tiefen Knorpeldefektes durch das Einbringen mit MSC beladener kollagener Trägermaterialien. Es wird sowohl die Mitwirkung von Sekretion parakrin oder autokrin wirkender Faktoren als auch eine Beteiligung der Zellen selbst diskutiert (Caplan et al. 2006). Diese Erkenntnisse geben Grund zu der Annahme, dass speziell die Verbindung von MSCs in Verbindung mit einer kollagenen Matrix einen

entscheidenden Beitrag in der zukünftigen Behandlung von Knorpeldefekten leisten kann. Hierfür ist es von großer Bedeutung, ein zellkompatibles, durch eine Kanüle applizierbares Kollagengel, wie das untersuchte Zwei - Komponentensystem der Firma Amedrix zur Verfügung zu haben. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen hervorragende Eigenschaften in der Zellverträglichkeit und gründen die Basis für einen weiterführenden klinischen Einsatz.

### **Zytotoxizitätstest im Life Cell Imaging (20GNL<sup>®</sup>)**

Anhand der vorhergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Mischung des Zwei - Komponenten Kollagengels der Firma Amedrix eine gute Kulturmatrix für die verwendeten kaninen ADMSCs darstellt. Es wird jedoch auch von der Firma Amedrix explizit darauf hingewiesen, dass der Aufenthalt der Zellen im Lösungsmittel 20GNL<sup>®</sup> vor der Vermischung der zwei Komponenten möglichst kurz gehalten werden sollte. Eine schnelle Verarbeitung des Zwei - Komponenten Systems wird somit empfohlen. Auf Grund dieser Tatsache bestand das Interesse an einer exemplarischen Untersuchung einer Zellpopulation unter Einfluss des hoch dosierten 20GNL<sup>®</sup> / DMEM Gemisches. Speziell in der klinischen Anwendung sollte eine kurze Verzögerung der Applikation nicht zu einem Zelltod innerhalb der Lösung führen. In der vorliegenden Untersuchung kann jedoch gezeigt werden, dass die Zellen auch nach zwei Stunden subjektiv bewertet eine hohe Vitalität besitzen. Eine Schrumpfung der Zellen und Apoptose wird erst nach fünf Stunden festgestellt. Die Ursachen hierfür finden sich höchstwahrscheinlich in der hyperosmolaren Zusammensetzung der 20GNL<sup>®</sup> Lösung, dessen negative Wirkung sich jedoch auf Grund der Mischung mit der verwendeten DMEM Lösung zugunsten des Versuches neutralisieren. Dem zur Folge scheint das Zwei - Komponenten Kollagengel der Firma Amedrix im Bezug auf die Zellverträglichkeit eine optimale Applikationslösung für kanine Stammzellen darzustellen.

Da es sich hier jedoch lediglich um einen exemplarischen Versuch mit subjektiver Auswertung handelt, sollte im Anschluss an diese Arbeit zur weiteren Verifizierung ein Versuch mit größerer Probenzahl erfolgen.

### **MTT Vergleichstest (LM (20GNL<sup>®</sup>);DMEM; Standard - Zellkulturmedium)**

Zusätzlich zum Zytotoxizitätstest soll ein Vergleich der Zellpopulationenvitalität bei unterschiedlicher Inkubation (1 h in DMEM, Lösungsmittel 20GNL<sup>®</sup> oder Standard –

Zellkulturmedium) im MTT Test erfolgen. Diese Untersuchung gibt Aufschluss über die möglichen Folgeschäden einer Zellkultur nach einer einstündigen Inkubation. Anhand von drei Versuchspopulationen können keine Differenzen in den anschließenden Absorptionsmessungen aufgezeigt werden. Resultierend hieraus zeigen das Wachstum und die Zellvitalität der untersuchten Zellpopulationen keine Unterschiede für die vorausgegangenen Inkubationen. Eine einstündige Inkubation im hyperosmolaren 20GNL<sup>®</sup> führt somit auch in diesem Versuch nicht zu einer Beeinträchtigung der Zellvitalität. Die Manipulation der Zellen durch die verschiedenen Mediumwechsel zeigt sich aber im Vergleich zum zuvor beschriebenen ersten MTT Test in allen Proben in einer generell schwächeren Proliferationskapazität. Auch in der Studie von Guth und Mitarbeitern (2013) kann eine anfängliche Abschwächung der Proliferation nach labortechnischer Manipulation der equinen Zellen nachvollzogen werden. Insgesamt scheint es jedoch auch nach einer Manipulation zur Regeneration des Proliferationsverhaltens zu kommen, so dass keine Beeinträchtigungen für einen klinischen Einsatz bestünden.

### Schlussfolgerung:

Die in dieser Arbeit etablierte Methode ermöglicht die *in vivo* Untersuchung, Quantifizierung und Verfolgung von implantierten markierten kaninen Stammzellen innerhalb des kaninen Kniegelenkes. Die hier präsentierten Forschungsergebnisse ermöglichen weitere Erkenntnisse in der Stammzellforschung und im Speziellen innerhalb des Tissue Engineering von hyalinem Knorpel. Da der Fokus dieser Arbeit auf der potentiellen klinischen Durchführbarkeit der Methode liegt, wäre es anhand der gewonnen Ergebnisse in Zukunft möglich, eine klinisch etablierte Methode der nicht invasiven Überwachung einer Stammzelltherapie mittels MRT zu planen und durchzuführen.

## 6 Zusammenfassung

Trotz vielfältiger Anwendung von Stammzelltherapien am lebenden Organismus ist der Verbleib und die biologische Aktivität der Stammzellen in vielen Fällen noch ungeklärt (Edelman et al. 2006, Tobias et al. 2012). Das Einbringen von mesenchymalen Stammzellen in Knorpeldefekte zählt zu den favorisierten Therapiekonzepten in der Regeneration von hyalinem Knorpel und ist zentraler Gegenstand vieler aktueller Forschungsvorhaben (Liu et al. 2002, Guo et al. 2004, Lopez-Laguna et al. 2011, Thiede et al. 2012).

Die *in vivo* Visualisierung von implantierten Stammzellen mittels Magnetresonanztomographie stellte eine nicht invasive Methode zur Erlangung weiterer Erkenntnisse über den Verbleib und Wirkmechanismus der Zellen dar.

In dieser Arbeit wurden die aus dem Fettgewebe gewonnen Stammzellen fünf junger Hunde isoliert und in einem standardisierten Verfahren mit Eisenoxidpartikeln (Endorem<sup>®</sup>, 308 µg Fe / ml) markiert. Anhand der Berliner Blau Färbung, sowie einer Elektronenmikroskopischen Betrachtung wurde die Markierungseffizienz sowie die zellinterne Verteilung bewertet. In verschiedenen *in vitro* Versuchen erfolgte die Untersuchung der potenziell negativen Einflüsse der Markierung auf die Zellvitalität, das Proliferationsverhalten sowie die Migrationsfähigkeit der Zellen. Nicht markierte Zellen derselben Stammzellspender dienten hierbei als negativ Kontrollgruppe.

Anschließend wurden die Zellen in eine Kollagenmatrix eingebracht und zusammen mit dieser in den zuvor geschaffenen standardisierten Knorpeldefekt im Kadaver-Kniegelenk implantiert. Es erfolgt die MRT Untersuchung im 1 Tesla Tomographen und Auswertung der gemessenen Signalintensitäten in der T2\* FFE gewichteten Sequenz. Parallel wurden in einem weiteren Schritt labortechnisch die *in vitro* Verträglichkeit und Anwendbarkeit des Zwei - Komponenten Kollagengels und seine Auswirkungen auf die Stammzellen evaluiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendete Endorem<sup>®</sup> - Konzentration von 308 µg Fe / ml Medium und das 24 h Inkubationsprotokoll zu einer ausreichenden Markierungseffizienz der kaninen Stammzellen führte. Des Weiteren wurden *in vitro* für diese Konzentration keine negativen Einflüsse der Markierung auf die biologischen Eigenschaften und die evaluierten Parameter der Stammzellen nachgewiesen. Hierfür wurden die Zellen einer Phalloidin Färbung, einer TEM Untersuchung, einem MTT Test unterzogen sowie mittels Life Cell Imaging

## 6 Zusammenfassung

untersucht. Der MTT Test zeigt mit einer Signifikanz von  $p = 0,014$  ( $p = 0,0034$ ), dass Endorem<sup>®</sup> interindividuell keinen nachweisbar negativen Einfluss auf die Zellproliferation hat. Die Studie weist jedoch in den *in vitro* Untersuchungen zu Wachstum und Proliferation deutliche Kulturunterschiede in den Zellpopulationen der verschiedenen Spender auf. Im Pearson Korrelationstest ergeben sich eine hohe Korrelation ( $r = 0,87$  MTT,  $r = 0,94$  Life Cell Imaging) für den Zusammenhang zwischen den verwendete Stammzellpopulationen und der jeweiligen Proliferations- und Migrationskapazität.

Die verschiedenen Zellpopulationen bewiesen in beiden Tests hoch signifikanten ( $p = 0,0012$  MTT,  $0,0008$  Life Cell Imaging) einen stärkeren Einfluss auf die Proliferation und Migration, im Vergleich zu den Auswirkungen der Endorem<sup>®</sup> - Markierung.

Bei der Evaluation der Verträglichkeit und Unschädlichkeit des Kollagengels zeigten sich *in vitro* exzellente Ergebnisse für die Zellvitalität und Migration innerhalb und außerhalb des Gels. Einzig die Verarbeitung des Gels im Bereich des Knorpeldefektes erwies sich auf Grund von Luft einschließen in der späteren MRT - Untersuchung als nachteilig.

Die subjektiv vom Untersucher ausgewerteten T2\* FFE gewichteten Aufnahmen bewiesen eine verlässliche Detektion der markierten Stammzellen im artifiziiell geschaffenen Knorpeldefekt des Kniegelenkes (im Bereich  $0,00 - 10,00 \times 10^5$  Zellen / ml). Mit steigender Zellkonzentration konnte eine invers proportionale, signifikante Abnahme der Signalintensität in der gemessenen Region of Interest (ROI) nachgewiesen werden ( $p = 0,016$ ).

Das eisenoxidhaltige Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> stellt somit in Kombination mit einem kollagenen Trägermaterial eine optimale Basis zum Nachweis von implantierten Stammzellen in der MRT dar. Die hier gewonnen Ergebnisse ermöglichen einen zukünftigen effektiven und kontrollierten klinischen Einsatz der Stammzellen am Tier und bieten die Möglichkeit, Wirkmechanismus und Verbleib der Zellen weiter zu erforschen.

## 7 Summary

In many cases the disposition and biological activity of stem cells remains unexplained despite manifold applicability of stem cell therapies for living organisms (Edelman et al. 2006, Tobias et al. 2012). The placement of mesenchymal stem cells in chondral defects is amongst the most favored therapy concepts for the regeneration of hyaline cartilage and is a central subject in many ongoing research projects (Liu et al. 2002, Guo et al. 2004, Lopez-Laguna et al. 2011, Thiede et al. 2012).

The *in - vivo* visualization of implanted stem cells by magnetic resonance tomography represented a non-invasive methodology in order to gain further insight about the disposition and mode of action of the cells.

Stem cells, obtained from the adipose tissue of five young dogs, have been isolated for this study and labelled with iron oxide particles (Endorem<sup>®</sup>, 308 µg Fe / ml) in a standardized procedure. The efficiency of the labelling and the intracellular distribution were assessed by using Prussian blue staining as well as electron microscope observation. Various *in - vitro* tests examined whether any potentially negative influences of the labelling on the cell viability, the proliferation or migration capacity could have been detected. The control group consisted of unlabeled cells of the same donor animal.

As a next step the cells were inserted in a collagenmatrix and collectively implanted in the artificially created standardized chondral defect within the stifle joint of the test carcass. An MRI examination is conducted using a 1 Tesla tomograph and analyzing the resulting signal intensities for the T2\* FFE sequence. The *in - vitro* compatibility and applicability of the two-component collagenous gel and its effects onto the stem cells were evaluated in the laboratory at the same time.

It was possible to provide evidence, that the applied concentration with Endorem<sup>®</sup> of 308 µg Fe / ml medium and the 24 h incubation procedure led to a sufficient labelling efficiency for canine stem cells. Furthermore there were no negative influences of the labelling onto biological properties and evaluated parameters of the stem cells detectable. The cells were examined by using a Phalloidin staining, a TEM investigation, an MTT test procedure as well as a culture insert during life cell imaging. The MTT test showed with significance level  $p = 0,014$  ( $p = 0,0034$ ) evidence that Endorem<sup>®</sup> had inter - individually no measurable negative effect for the

## 7 Summary

proliferation of cells. The study demonstrated indeed significant differences of the various cultures of donor cell lines regarding growth and proliferation during the *in vitro* investigations. Correlating according to Pearson's test, the results are a highly significant correlation ( $r = 0,87$  MTT,  $p = 0,94$  life cell imaging) for the interdependencies between the stem cell populations and the relevant proliferation and migration capacities.

The influence of different cell populations supersedes with high significance level ( $p = 0,0012$  MTT,  $p = 0,0008$  life cell imaging) in both test methods the influence of the Endorem® labelling onto proliferation and migration.

The evaluation of compatibility and neutrality of the collagen gel was proven by excellent *in vitro* results for cell vitality and migration within and outside the gel. Solely the treatment of the gel within the area of the chondral defect negatively affected by embedded air blisters the following MRT imaging analysis.

By analyzing the T2\* FFE imaging subjectively the examiner was able to verify a reliable detection of the labelled stem cells within the artificially created chondral defect of the knee joint (range:  $0,00 - 10,00 \times 10^5$  cells / ml). The increase of the cell concentration resulted in an inversely proportional, significant reduction of signal intensity within the measured region of interest (ROI) ( $p = 0,016$ ).

The Endorem® containing iron oxide in combination with a collagenous matrix is therefore an optimal basis in order to verify implanted stem cells by using MRT. The demonstrated results in this study enable an effective and controlled clinical application of stem cells for animals in the future and provide the basis to further examine mode of action and disposition of the cells.

## 8 Literaturverzeichnis

**Arbab A.S., Yocum G. T., Kalish H., Jordan E. K., Anderson S. A., Khakoo A. Y., Read E. J., Frank J. A. (2004)**, Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI.

*Blood Vol. 104 S. 1217 - 1223*

**Arbesser E. (1974)**, Osteochondrosis dissecans der Femurkondylen beim Hund.

*Wien. Tierärztliche Monatsschrift Vol. 61 S. 303 - 313*

**Arokoski J. P., Hyttinen M. M., Helminen H. J., Jurvelin J. S. (1999)**,

Biomechanical and structural characteristics of canine femoral and tibial cartilage.

*Journal of Biomedical Materials Research Vol. 48 S. 99 – 107*

**Baird D. K., Hathcock J. T., Rumph P. F., Kincaid S. A., Visco D. M. (1998)**, Low-

Field Magnetic Resonance Imaging Of The Canine Stifle Joint: Normal Anatomy.

*Veterinary Radiology and Ultrasound Vol. 39/2 S. 87 – 97*

**Banfield C. M., Morrison W. B. (2000)**, Magnetic Resonance Arthrography of the

Canine Stifle Joint: Technique and Applications in Eleven Military Dogs.

*Veterinary Radiology and Ultrasound Vol. 41 S. 200 – 213*

**Bernsen M. R., Moelker A. D., Wielopolski P. A., Van Tiel S. T., Krestin G. P.**

**(2009)**, Labelling of mammalian cells for visualisation by MRI.

*European Radiology Vol. 20 S. 255 – 274*

**Bertolo A., Steffen F., Malonzo-Marty C., Stoyanov J. (2015)**, Canine

Mesenchymal Stem Cell Potential and the Importance of Dog Breed: Implication for Cell-Based Therapies.

*Cell Transplantation Vol. 24 S. 1969 – 1980*

**Blond L., Thrall D.E., Roe S.C., Chailleux N., Robertson I.D. (2008)**, Diagnostic Accuracy of Magnetic Resonance Imaging for Meniscal Tears in Dogs Affected with Naturally Occurring Cranial Cruciate Ligament Rupture.

*Veterinary Radiology and Ultrasound Vol. 49 S. 425 - 431*

**Böttcher P., Zeissler M., Maierl J. (2009)**, Mapping of split-line pattern and cartilage

thickness of selected donor and recipient sites for autologous osteochondral

transplantation in the canine stifle joint. *Veterinary Surgery Vol. 38 S. 696 - 704*

**Böttcher P., Zeissler M., Winkels P., Ludewig E., Maierl J., Grevel V. (2007)**,

Mosaicplasty in the elbow of a dog: Instrumentation and evaluation of achieved joint congruency by computed tomography and computed tomographic osteoabsorptiometry.

*Tierärztliche Praxis, Kleintiere Heimtiere Vol. 35 S. 253 - 260*

**Böttcher P. (2010)**, Morphologische und topographische Charakterisierung von

Entnahme- und Empfängerregionen für die autologe osteochondrale Transplantation zur Behandlung der Osteochondrosis dissecans am Kniegelenk des Hundes,

*Habilitationschrift, Universität Leipzig*

**Boileau C., Martel-Pelletier J., Abram F., Raynauld J. P., Troncy È., D'Anjou M. A., Moreau M., Pelletier J. P. (2008)**, Magnetic resonance imaging can accurately assess the long-term progression of knee structural changes in experimental dog osteoarthritis.

*BMJ Journals Annals of the Rheumatic Diseases* Vol. 67 S. 926 – 932

**Bos C., Delmas Y., Desmouliere A., Solanilla A., Hauger O., Grosset C., Dubus I., Ivanovic Z., Rosenbaum J., Charbord P., Combe C., Bulte J. W., Moonen C. T., Ripoche J., Grenier N. (2004)**, In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver.

*Radiology* Vol. 233/3 S. 781 – 789

**Bosch P., Musgraves D. S., Lee J. Y., Cummins J., Shuler T., Ghivizzani T. C., Evans T., Robbins T. D., Huard (2000)**, Osteoprogenitor cells within skeletal muscle.

*Journal of Orthopedic Research* Vol. 18/6 S. 933 – 944

**Bourdrieau R. J., Hohn R. B., Bardet J. F. (1983)**, Osteochondritis dissecans of the elbow in the dog.

*Journal of the American Animal Hospital Association* Vol. 19 S. 627 - 635

**Breur G.J., Spaulding K.A., Braden T.D. (1989)**, Osteochondritis dissecans of the medial trochlear ridge of the talus in the dog.

*Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* Vol. 4 S. 168

**Bulte J. W. (2009)**, In vivo MRI cell tracking: clinical studies.

*American Journal of Roentgenology* Vol. 193 S. 314 – 325

**Bulte J. W., Kraitchman D. L., Mackay A. M., Pittenger M. (2004)**, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labelling with ferumoxides.

*Blood* Vol. 104 S. 3410 - 3413

**Bushberg J. T., Seibert J. A., Leidhold E. M., Boone J. M. (2002)**, The Essential Physics of Medical Imaging. Second Edition, *Lippincott Williams and Wilkins*

**Butterworth S., Cook J. (2006)**, The shoulder. In: *Houlton J., Cook J., Innes J. und Langley-Hobbs S., Hrsg. BSAVA Manual of canine and feline musculoskeletal disorders. Gloucester, England: British Small Animal Veterinary Ass. S. 212 - 230*

**Caplan A. L. (1989)**, Cell and molecular strategies for massive bone repair/regeneration.

*Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. Vol. 63/5 S. 692 - 699

**Caplan A. L. (1991)**, Mesenchymal stem cells.

*Journal of Orthopedic Research* Vol. 9 S. 641 – 650

**Caplan A. L. (2007)**, Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.

*Journal of Cellular Physiology* Vol. 213/2 S. 341 -347

**Caplan A. L., Dennis J. E. (2006)**, Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* Vol. 98 S. 1076 - 1084

**Chambon C., Clement O., Le Blanche A., Schouman-Claeys E., Fria J. G. (1993)**, Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence. *Magnetic Resonance Imaging* Vol. 11 S. 509 – 519

**Chen F. H., Tuan R. S. (2008)**, Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Research and Therapy* Vol. 10 S. 223

**Cheng K., Gupta S. (2009)**, Quantitative tools for assessing the fate of xenotransplanted human stem/progenitor cells in chimeric mice. *Xenotransplantation* Vol. 16 S. 145 - 151

**Chiang H., Kuo T. F., Tsai C. C. (2005)**, Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* Vol. 23 S. 584 – 593

**Clarke I. (1971)**, Articular cartilage: a review and electron microscopy study. *The Bone & Joint Journal Br.* Vol. 53 S. 732 – 750

**Clayton-Jones D. G. (1980)**, Osteochondritis dissecans des Kniegelenks. *Kleintier Praxis* Vol. 25 S. 441 – 443

**Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G. L., Pistoia V., Uccelli A. (2006)**, Human mesenchymal stem cells modulate b-cell functions. *Blood* Vol. 107/1 S. 367 - 372

**Costa J., Madeira M. (1982)**, Changes in structure of the facial bones after experimental fracture and displacement of the zygomatic bone in the tufted capuchin (*Cebus apella*) by means of radiography, the split-line technique, and scanning electron microscopy. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* Vol. 59 S. 321 – 336

**Daldrup-Link H. E., Rudelius M., Oostendorp R. A. J., Settlers M., Piontek G., Metz S., Rosenbrock H., Keller U., Heinzmann U., Rummeny E. J., Schlegel J., Link T. M. (2003)**, Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* Vol. 228 S. 760 – 767

**Denny H. R., Gibbs C. (1980)**, Osteochondritis dissecans of the canine stifle joint. *Journal of Small Animal Practice* Vol. 21 S. 317 - 322

**Dhollander A. A. M., Verdonk P. C. M., Lambrecht S. (2012)**, Midterm results of the Treatment of Cartilage Defects in the Knee Using Alginate Beads Containing Human Mature Allogenic Chondrocytes. *The American Journal of Sports Medicine* Vol. 40 S. 75 – 82

**Eckstein F., Tieschky M., Faber S. C., Haubner M., Kolem H., Englmeier K. H., Reiser M. (1998)**, Effect of physical exercise on cartilage volume and thickness in vivo: MR imaging study.

*Radiology Vol. 207 S. 243 – 248*

**Edelman R. R., Hesselink J. R., Zlatkin M. B., Crues J. V. (2006)**, Clinical Magnetic Resonance Imaging. Auflage: 3, *Elsevier Inc*

**Ekman S., Carlson C. S. (1998)**, The pathophysiology of osteochondrosis.

*Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice Vol. 28 S. 17 – 32*

**Embryonenschutzgesetz EschG (2011)**, Gesetz zum Schutz von Embryonen.

<http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/eschg/gesamt.pdf> (15.11.2015)

**Evans H. E., De Lahunta A. (2012)**, Miller's Anatomy of the Dog *Saunders W.B.*

**Fahlvik A. K., Klaveness J., Stark D. D. (1993)**, Iron oxides as MR imaging contrast agents.

*Journal of Magnetic Resonance Imaging Vol. 3 S. 187 – 194*

**Farrell E., Wielopolski P., Pavljasevic P., Van Tiel S., Jahr H., Verhaar J., Weinans H., Krestin G., O`Brein F. J., van Osch G., Bernsen M. (2008)**, Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo.

*Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 369/4 S. 1076 - 1081*

**Fayolle P., Ormieres P., Autefage A., Genevois J. P., Cazieux A. (1987)**,

Osteochondrose du grasset chez le chien. Synthese bibliographique et presentation d'un cas.

*Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie Vol. 22 S. 41 – 53*

**Feng Y., Jin X., Dai G., Liu J. (2011)**, In Vitro Targeted Magnetic Delivery and Tracking of Superparamagnetic Iron Oxide Particles Labeled Stem Cells for Articular Cartilage Defect Repair.

*Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences Vol. 31 S. 204 – 209*

**Fitzpatrick N., Yeadon R., Van Terheijden C., Smith T. J. (2012)**, Osteochondral autograft transfer for treatment of osteochondritis dissecans of the medial femoral condyle of dogs.

*Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology Vol. 24 S. 135 – 143*

**Foltin I., Rieden K., Matis U. (2004)**, Kernspintomographische Darstellung und Beurteilung von Kniegelenkerkrankungen des Hundes.

*Tierärztliche Praxis Vol. 32 S. 1 – 8*

**Fossum T. W. (2007)**, Small Animal Surgery, Third Edition, *MOSBY Elsevier*, S. 1299 - 1301

**Frangioni J. V., Hajjar R. J. (2004)**, In Vivo Tracking of Stem Cells for Clinical Trials in Cardiovascular Disease.

*Circulation Journal of the American Heart Association Vol. 110 S. 3378 – 3383*

**Frank J. A., Miller B. R., Arbab A. S., Zywicke H. A., Jordan E. K., Lewis B. K., Bryant L. H., Bulte J. W. M. (2003)**, Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Combining Superparamagnetic Iron Oxides and Transfection Agents.

*Radiology Vol. 228 S. 480 – 487*

**Freudenberg N., Kortsik C., Ross A. (2002)**, Grundlagen der Zytopathologie: Kurzlehrbuch der allgemeinen und speziellen Zytodiagnostik, *Karger*

**Gao J., Yao J. Q., Caplan A. L. (2007)**, Stem cells for tissue engineering of articular cartilage.

*Proc Inst Mech Eng H. Vol. 221 S. 441 – 450*

**Gavin P. R., Bagley R. S. (2009)**, Practical Small Animal MRI. *Wiley Blackwell*

**Gerichtshof der Europäischen Union, Pressemitteilung Nr. 112/11 (2011)**, Ein Verfahren, das durch die Entnahme von Stammzellen, die aus einem menschlichen Embryo im Blastozystenstadium gewonnen werden, die Zerstörung des Embryos nach sich zieht, ist von der Patentierung auszuschließen.

<http://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2011-10/cp110112de.pdf> (15.11.2015)

**Geva T. (2006)**, Magnetic resonance imaging: historical perspective.

*Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance Vol. 8/4 S. 573 - 580*

**Goergen J. (2014)**, Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks aus Osteoporose-Modellen der Ratte. *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*

**Goldman R. D., Spector D. (2005)**, Live cell imaging: a laboratory manual.

*Cold Spring Harbor Laboratory Press*

**Gomori J. M., Grossmann R. I. (1988)**, Mechanisms responsible for the MR appearance and evolution of intracranial hemorrhage.

*RadioGraphics Vol. 8/3 S. 427 – 440*

**Gronalden J. (1979)**, Arthrosis in the elbow joint of young rapidly growing-dogs. A review of the literature. Occurrence, clinical and radiographical findings.

*Nordisk Veterinary Medicin Vol. 31 S. 62 - 75*

**Guerbet GmbH, Wissenschaftliche Information Endorem®**

**Guo X., Wang C., Zhang Y., Xia R., Hu M., Duan C., Zhao Q., Dong L., Lu J., Song Y.Q. (2004)**, Repair of Large Articular Cartilage Defects with Implants of Autologous Mesenchymal Stem Cells Seeded into  $\beta$ -Tricalcium Phosphate in a Sheep Model.

*Tissue Engineering Vol. 10 S. 1818 – 1829*

## 8 Literaturverzeichnis

**Guth S.V. (2013)**, Untersuchung zur Differenzierung equiner, adipogener, mesenchymaler Stammzellen zu Tenozyten. *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*

**Haapala J., Arokoski J., Pirttimäki J., Lyyra T., Jurvelin J. Tammi M., Helminen H. J., Kiviranta I. (2000)**, Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization. *International Journal of Sports Medicine Vol. 21 S. 76 – 81*

**Hamm B., Staks T., Taupitz M., Maibauer R., Speidel A., Huppertz A., Frenzel T., Lawaczeck R., Wolf K. J., Lange L. (1994)**, Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: First experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *Journal of Magnetic Resonance Imaging Vol. 4 S. 659 – 668*

**Harari J. (1998)**, Osteochondrosis of the femur. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice Vol. 28 S. 87*

**Hazewinkel H. A. W., Theyse L. F. H., Meij B. P. (2000)**, Non-surgical treatment of elbow dysplasia. *Proceedings of the 10th Annual ESVOT Congress, Munich, Germany*

**Hecht S. (2010)**, Röntgendiagnostik in der Kleintierpraxis. *Schattauer S.351-352*

**Hermann H. J. (1998)**, Nuklearmedizin, 4 Auflage. *Urban und Schwarzenberg,*

**Horst C., Brunberg L. (2000)**, Osteochondrosis dissecans beim Hund – Therapieergebnisse einer retrospektiven Studie (1993-1998) unter Berücksichtigung des Patientenalters, der Lahmheitsdauer und der klinischen und röntgenologischen Befunde vor und nach der Operation. *Kleintierpraxis Vol. 45 S. 573 - 591*

**Hüffner K., Lindner S. (2001)**, Leuchtende Skelette: Fluoreszenz-Färbungen und Manipulation des Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen. *Immunologie Aktuell 1 (5) S. 88 – 94*

**Hunziker E. B. (2002)**, Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage Vol. 10 S. 432 – 463*

**Ittrich H., Lange C., Dahnke H., Zander A. R., Adam G., Nolte-Ernsting C. (2005)**, Untersuchung zur Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Nachweisbarkeit in der MRT bei 3 T. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren Vol. 177/8 S. 1151 – 1163*

**Jackson D. W., Scheer M. J., Simon T. M. (2001)**, Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons Vol. 9 S. 37 - 52*

## 8 Literaturverzeichnis

**Joest E. (1969)**, Handbuch der speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere, Band I Bewegungsapparat, 3 Auflage. *Paul Parey*

**Johnson J. A., Austin C., Breur G. J. (1994)**, Incidence of canine appendicular musculoskeletal disorders in 16 veterinary teaching hospitals from 1980 through 1989.

*Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology Vol. 7 S. 56 – 69*

**Johnson K. A., Pettit G. D. (1980)**, Osteochondrosis in the hock joints in dogs.

*Journal of the American Animal Hospital Association Vol. 16 S. 103 – 113*

**Johnston S.A. (1998)**, Osteochondritis dissecans of the humeral head.

*Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice Vol. 28 S. 33*

**Josephson L., Lewis J., Jacobs P., Hahn P. F., Stark D. D. (1988)**, The effects of iron oxides on proton relaxivity.

*Magnetic Resonance Imaging Vol. 6 S. 647 – 653*

**Jung M., Kaszap B., Redöhl A., Steck E., Breusch S., Richter W., Gotterbarm T. (2009)**, Enhanced Early Tissue Regeneration after Matrix-Assisted Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Full Thickness Chondral Defects in a Minipig Model.

*Cell Transplantation Vol. 18 S. 923 - 932*

**Jurvelin J., Kiviranta I. (1989)**, Effect of physical exercise on indentation stiffness of articular cartilage in the canine knee.

*International Journal of Sports Medicine Vol. 7 S. 106 – 110*

**Kedziorek D. A., Kraitchman D. L. (2010)**, Superparamagnetic iron oxide labeling of stem cells for MRI tracking and delivery in cardiovascular disease.

*Methods in Molecular Biology Vol. 660 S. 171 - 183*

**Kempson G. E., Freeman M. A., Swanson S. A. (1968)**, Tensile properties of articular cartilage.

*Nature Vol. 220 S. 1127 – 1128*

**King K. B., Opel C. F., Rempel D. M. (2005)**, Cyclical articular joint loading leads to cartilage thinning and osteopontin production in a novel in vivo rabbit model of repetitive finger flexion.

*Osteoarthritis Cartilage Vol.13 S. 971 – 978*

**Kiviranta I., Jurvelin J., Tammi M., Säämänen A. M., Helminen H. J. (1987)**, Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs.

*Arthritis & Rheumatology Vol. 30 S. 801 – 809*

**Kiviranta I., Tammi M., Jurvelin J. Säämänen A. M., Helminen H. J. (1988)**, Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs.

*Journal of Orthopaedic Research Vol. 6 S. 188 - 195*

**Kiviranta I., Tammi M., Jurvelin J., Arokoski J., Säämänen A. M., Helminen H. (1994)**, Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the young canine knee joint after remobilization of the immobilized limb. *Journal of Orthopaedic Research* Vol. 12 S. 161 – 167

**König H. E., Liebich H. G. (2011)**, Anatomie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Auflage: 5, *Schattauer*

**Koga H., Muneta T., Nagase T. (2008)**, Comparison of mesenchymal tissue-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Research* Vol. 333/2 S. 207 – 215

**Kolecka M. A. (2014)**, Untersuchung zum Wachstums- und Signalverhalten von kaninen mesenchymalen Stammzellen nach Endorem – Markierung im MRT, *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*

**Kon E., Filardo G., Roffi A., Andriolo L., Marcacci M. (2012)**, New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* Vol. 5 S. 236 - 243

**Konar M., Kneissl S., Vidoni B., Lang J., Mayrhofer E. (2005) (a)**, Niederfeld-Magnetresonanztomographie am Kniegelenk des Hundes, Teil 1: Untersuchungsprotokolle und Sequenzen. *Tierärztliche Praxis* Vol. 33 S. 5 – 14

**Konar M., Vidoni B., Kneissl S., Doherr M., Mayrhofer E., Lang J. (2005) (b)**, Niederfeld- Magnetresonanztomographie am Kniegelenk des Hundes, Teil 2: Verteilung pathologischer Veränderungen und Korrelation mit Operationsbefunden. *Tierärztliche Praxis* Vol. 33 S. 73 – 82

**Kostura L., Kraitchmann D. L., Mackay A. M., Pittenger M. F., Bulte J. W. M. (2004)**, Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomedicine* Vol. 17 S. 513 - 517

**Kraitchman D. L., Bulte J. W. (2008)**, Imaging stem cells with MRI. *Basic Research Cardiology* Vol. 103 S. 105 - 113

**Kruttwig K. (2009)**, Molekulare Markierungsstrategien für die optische und magnetresonanztomographische zelluläre Visualisierung. *Dissertation, RWTH Aachen*

**Kühl S., Kühl M. (2012)**, Stammzellbiologie. *UTB GmbH*

**Küstermann E., Himmelreich U., Kandal K., Geelen T., Ketkar A., Wiedermann D., Strecker C. Esser J., Arnhold S., Hoehn M. (2008)**, Efficient stem cell labeling for MRI studies. *Contrast Media and Molecular Imaging* Vol. 3/1 S. 27 -37

**LaFond E., Breur G. J., Austin C. C. (2002)**, Breed susceptibility for developmental orthopedic diseases in dogs.

*Journal of the American Animal Hospital Association Vol. 38 S. 467 - 477*

**Langdorn S. P. (2004)**, Cancer Cell Culture, Methods and Protocols.

*Humana Press Inc.*

**Li G., Park S. E., DeFrate L. E., Schutzer M. E., Ji L., Gill T. J. Rubash H. E. (2005)**, The cartilage thickness distribution in the tibiofemoral joint and its correlation with cartilage-to-cartilage contact.

*Clinical Biomechanics Vol. 20 S. 736 – 744*

**Li Y. G., Wei J. N., Lu J., Wu X. T., Teng G. J. (2011)**, Labeling and tracing of bone marrow mesenchymal stem cells for tendon-to-bone tunnel healing.

*Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy Vol. 19 S. 2153 - 2158*

**Liang C. C., Park A. Y., Guan J. L. (2007)**, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.

*Nature Protocols Vol. 2 S. 329 - 333*

**Liebich H. G. (2004)**, Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Auflage: 4, *Schattauer*

**Litzke L. E., Wagner E., Baumgaertner W., Hetzel U., Josimovic-Alasevic O., Libera J. (2004)**, Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation.

*Annals of Biomedical Engineering Vol. 32 S. 57 - 69*

**Liu Y., Chen F., Liu W. et al. (2002)**, Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage.

*Tissue Engineering Vol. 8 S. 709 - 721*

**Lopez-Laguna M., Saldana-Diaz A., Ramos-Pascua L. R. (2011)**, Labelling of Adipose Derived Mesenchymale Stem Cells for Cell Tracking Using MRI in Bone Tissue Engineering.

*Revista Espanola de Cirugia Ortopedica y Traumatologia Vol. 55 S. 369 – 377*

**McRobbie D. W., Moore E. A., Graves M. J., Prince M. R. (2007)**, MRI from Picture to Proton. Second Edition, *Cambridge University Press*

**Mihaljevic M., Kramer M., Gomercic H. (2009)**, CT- und MRT-Atlas: Transversalanatomie des Hundes, *Enke*

**Min B.H., Woo J.I., Kim W.H., Kwweon O. K., Triffitt J. T., Choi B. H., Park S. R. (2007)**, The fate of implanted autologous chondrocytes in regenerated articular cartilage.

*Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Vol. 221 S. 461-465*

**Mizraih J., (1985)**, The „instantaneous“ deformation of cartilage: effects of collagen fibre orientation and osmotic stress.

*Transactions of the Orthopedic Society Vol. 204*

- Montgomery R. D., Milton J. L., Henderson R. A., Hathcock J. T. (1989),** Osteochondritis dissecans of the canine stifle.  
*Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian Vol. 11 S. 1199 -1205*
- Morgan J. P., Wind A., Davidson A. P. (2000),** Hereditary bone and joint diseases in the dog. *Schlütersche*
- Moroni L., Fornasari P. M. (2012),** Human mesenchymal stem cells: A bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues.  
*Journal of Cellular Physiology Vol. 228 S. 680 - 687*
- Müller-Gerbi M., Schulte E., Putz R. (1987),** The thickness of the calcified layer of articular cartilage: a function of the load supported?  
*Journal of Anatomy Vol. 154 S.103 – 111*
- Mulisch M., Welsch U. (2010),** Romeis – Mikroskopische Technik, 18. Auflage, *Springer Spektrum*
- Necas A., Dvorak M., Zatloukal J. (1999),** Incidence of Osteochondrosis in Dogs and Its late Diagnosis.  
*Acta Veterinaria Brunensis Vol. 68 S. 131 – 139*
- Neupane M., Chang C. C., Kiupel M., Yuzbasiyan-Gurkan V. (2008),** Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells.  
*Tissue Engineering Part A Vol. 14/6 S. 1007 - 1015*
- Newton P. M., Mow V. C., Gardner T. R., Buckwalter J. A., Albright J. P. (1997),** The Effect of Lifelong Exercise on Canine Articular Cartilage.  
*American Journal of Sports Medicine Vol. 25 S. 282 - 287*
- Nickel R., A. Schummer, E. Seiferle (2003),** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I: Bewegungsapparat. Auflage: 8, *Enke*
- Nohroudi K., Arnjhold S., Berhorn T., Addicks K., Hoehn M., Himmelreich U. (2010),** In vivo MRI Stem Cell Tracking Requires Balancing of Detection Limit and Cell Viability.  
*Cell Transplantation Vol. 19/4 S. 431 – 441*
- Norman A. B., Thomas S. R., Pratt R. G., Lu S. Y., Norgren R. B. (1992),** Magnetic resonance imaging of neural transplants in rat brain using a superparamagnetic contrast agent.  
*Brain Research Vol. 594 S. 279 – 283*
- O’Grady J. E., Bordon D. M. (2003),** Global regulatory registration requirements for collagen-based combination products: points to consider.  
*Advanced Drug Delivery Reviews Vol. 55/12 S. 1699 - 1721*

## 8 Literaturverzeichnis

- Olsson S. E. (1993)**, Pathophysiology, morphology, and clinical signs of osteochondrosis in the dog. *Bojrab M. J. Disease mechanisms in small animal surgery. Lea u. Febiger, Philadelphia, 2 Auflage, S. 777 - 796*
- Poole C. A. (1997)**, Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of Anatomy Vol. 191 S. 1 - 13*
- Ramasamy R., Fazekasova H., Lam E. W., Soeiro I., Lombardi G., Dazzi F. (2007)**, Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation Vol. 83 S. 71 -76*
- Recht M., Bobic V., Burstein D. (2001)**, Magnetic resonance imaging of articular cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research Vol. 391 S. 379 - 396*
- Reich C. M. (2014)**, Charakterisierung des Wachstums- und Differenzierungspotentials caniner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe. *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*
- Reiser M., Semmler W. (2002)**, Magnetresonanztomographie, 3. Auflage, *Springer Medizin Verlag*
- Roth P. (2009)**, In vivo Visualisierung mesenchymaler Stammzellen nach lokaler Transplantation im schweren Sklettmuskeltrauma der Ratte. *Dissertation, FU - Berlin*
- Roth V., Mow V. C. (1980)**, The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *The Bone & Joint Journal Vol. 62 A S. 1102 - 1118*
- Rummeny E. J., Reimer P., Heindel W. (2006)**, Ganzkörper-MR Tomographie. 2. Auflage, *Thieme Verlag*
- Sadek H., Latif S., Collins R., Garry M. G., Garry D. J. (2008)**, Use of ferumoxides for stem cell labeling. *Regenerative Medicine Vol. 3 S. 807 – 816*
- Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. (2005)**, Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and Rheumatology Vol. 52/8 S. 2521 - 2529*
- Saldanha K. J., Piper S. L., Ainslie K. M., Kim H. T., Majumdar S. (2008)**, Magnetic resonance imaging of iron oxide labeled stem cells: applications to tissue engineering based regeneration of the intervertebral disc. *European Cells & Materials Vol. 16 S. 17 – 25*
- Salomon F. V., Geyer H., Gille U. (2008)**, Anatomie für die Tiermedizin. 2. Auflage *Enke*

- Schwarz C., Leicht U., Rothe C., Drosse I., Luibl V., Röcken M., Schieker M. (2012)**, Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells.  
*Research in Veterinary Science Vol. 93 S. 457 - 462*
- Schnorr B., Kressin M. (2006)**, Embryologie der Haustiere. 5. Auflage, *Enke*  
**Scott H. (1999)**, Non-traumatic causes of lameness in the hindlimb of the growing dog.  
*Companion Animal Practice Vol. 21 S. 176 - 188*
- Shell K. N. (2012)**, The influence of hypoxia, strain and growth differentiation factors on equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*
- Siegel G., Kluba T., Hermanutz-Klein U., Bieback K., Northoff H., Schäfer R. (2013)**, Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.  
*BMC Medicine 11:146*
- Simon W. H. (1970)**, Scale effects in animal joints. Articular cartilage thickness and compressive stress.  
*Arthritis & Rheumatology Vol. 13 S. 244 – 255*
- Soenen S. J., Nuytten N., De Meyer S. F., De Smedt S. C., De Cuyper M (2010)**, High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling.  
*Small Vol. 6 S. 832 - 842*
- Spaggiari G. M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M. C., Moretta L. (2008)**, Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3—dioxygenase and prostaglandine e2.  
*Blood Vol. 111 S. 1327 – 1333*
- Stammzellgesetz StZG (2013)**, Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen.  
<http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/stzsg/gesamt.pdf> (15.11.2015)
- Steinhagen J.,Kurz B., Niggemeyer O., Bruns J. (2001)**, The pathophysiology of cartilage diseases.  
*Orthopedia, traumatologia, rehabilitacja Vol. 3 S. 163 - 168*
- Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. (2003)**, Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells.  
*Bone Vol 33/6 S. 919 - 926*
- Stroh A. (2006)**, Bildgebung von magnetisch markierten Stammzellen in experimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mittels zellulärer Magnetresonanztomographie. *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin*

**Sykova E., Jendelova P. (2006)**, Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord.  
*Neurodegenerative Diseases Vol. 3 S. 62 -67*

**Tapp H., Hanley J., Patt J. C., Gruber H. E. (2009)**, Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair.  
*Experimental biology and medicine (Maywood) Vol. 234 S. 1 – 9*

**Thiede R. M., Lu Y., Markel M. D. (2012)**, A review of the treatment methods for cartilage defects.  
*Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology Vol. 25/4 S.263 - 272*

**Thorek D. L., Tsourkas A. (2008)**, Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells.  
*Biomaterials Vol. 29 S. 3583 – 3590K*

**Tobias K. M., Johnston S. A. (2012)**, Veterinary Surgery Small Animal, SAUNDERS Elsevier

**Tögel F., Weiss K., Yang Y., Hu Z., Zhang P., Westenfelder C. (2007)**, Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury.  
*American Journal of Physiology - Renal Physiology Vol. 292/5 S. 1626 - 1635*

**Tratting S., Mlynarik V., Huber M. (2000)**, Magnetic Resonance Imaging of Articular Cartilage and Evaluation of Cartilage Disease.  
*Investigative Radiology Vol. 35 S. 595 - 601*

**Trostel C. T., McLaughlin R. M., Pool R. R. (2002)**, Canine lameness caused by developmental orthopedic diseases: Osteochondrosis.  
*Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian Vol. 24 S. 836*

**Trzeciak T., Kruczynski J., Jaroszewski J. (2006)**, Evaluation of cartilage reconstruction by means of autologous chondrocyte versus periosteal graft transplantation: an animal study.  
*Transplantation Proceedings Vol. 38 S. 305 – 311*

**Tse W. T., Pendleton J. D., Beyer W. M., Egalka M. C., Guinan E. C. (2003)**, Suppression of allogeneic t-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation.  
*Transplantation Vol. 75 S. 389 – 397*

**Ubbink G. J., Knol B. W., Bouw J. (1992)**, The relationship between homozygosity and the occurrence of specific diseases in Bouvier Belge des Flandres dogs in the Netherlands.  
*Veterinary Quarterly Vol. 14 S. 137 – 140*

**Van Bree H., Degryse H., Vanryssen B., Ramon F., Desmidt M. (1993)**, Pathological correlations with magnetic-resonance images of osteochondrosis lesions in canine shoulders.  
*Journal of the American Veterinary Medical Association Vol. 202 S. 1099 – 1105*

**Van Buul G. M., Kotek G., Wielopolski P. A., Farrell E. (2011)**, Clinically Translatable Cell Tracking and Quantification by MRI in Cartilage Repair Using Superparamagnetic Iron Oxides. *PLOS ONE* 6/2

**Veit C. (2011)**, Proliferations- und Differenzierungspotential oviner und equiner mesenchymaler Stammzellen nach Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln sowie deren Nachverfolgbarkeit mittels Magnetresonanztomographie, *Dissertation, Universität Leipzig*

**Veitinger T. und Jiang Z. (2012)**, Live-cell Imaging Techniques – Visualizing the Molecular Dynamics of Life. *Science Lab, Leica Microsystems*, <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/live-cell-imaging-techniques> (15.11.2015)

**Vieira N. M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B. E., Zatz M. (2010)**, Isolation, characterisation and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell transplantation* Vol. 19 S. 279 – 289

**Volk S. W., Wang Y., Hankenson K. D. (2012)**, Effects of Donor Characteristics and Ex Vivo Expansion on Canine Mesenchymal Stem Cell Properties: Implications for MSC-Based Therapies. *Cell Transplantation* Vol. 21 S. 2189 – 2200

**Wakitani S., Goto T., Pineda S. J., Young R. G., Mansour J. M., Caplan A. L., Goldberg V. M. (1994)**, Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery* Vol. 76 S. 579 - 592

**Wayne J. S., McDowell C. L., Shields K. J., Tuan R. S. (2005)**, In Vivo Response of Poly(lactic Acid)-Alginate Scaffolds and Bone Marrow-Derived Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering* Vol. 11. 5/6 S. 953 – 963

**Weishaupt D., Köchli V. D., Marincek B. (2009)**, Wie funktioniert MRI? 6. Auflage, *Springer Medizin Verlag*

**Welsch U., Sobotta J. (2003)**, Lehrbuch Histologie. *Urban & Fischer bei Elsevier*

**Westbrook C., Kaut Roth C., Talbot J. (2011)**, MRI in Practice, 4th Edition. *Wiley-Blackwell*

**Widmer W.R., Buckwalter K.A., Braunstein E.M., Visco D.M., O'Connor B.L. (1991)**, Principles of magnetic resonance imaging and application to the stifle joint in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* Vol. 198 S. 1914 – 1922

**Widmer W.R., Buckwalter K.A., Braunstein E.M., Hill M.A., O'Connor B.L., Visco D.M. (1994)**, Radiographic and magnetic resonance imaging of the stifle joint in experimental osteoarthritis of dogs.

*Veterinary Radiology and Ultrasound Vol. 35 S. 371 – 383*

**Wiesner E., Ribbeck R. (2000)**, Lexikon der Veterinärmedizin.

*Enke Verlag*

**Wilson K., Walker J. (2010)**, Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Seventh Edition.

*Cambridge University Press*

**Yanai T., Ishii T., Chang F. (2005)**, Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit: the effects of joint distraction and autologous bone marrow-derived mesenchymal cell transplantation.

*Journal of Bone and Joint Surgery Br Vol. 87 S. 721 – 729*

**Young H. E., Black A. C. (2004)**, Adult stem cells. The Anatomical Record.

*Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology Vol. 276/1 S. 75 -102*

**Ytrehus B., Carlson C. S., Ekman S. (2007)**, Etiology and pathogenesis of osteochondrosis.

*Veterinary Pathology Vol. 44 S. 429 – 448*

**Zheng M. H., Willers C., Kirilak L., Yates P., Xu J. K., Wood D., Shimmin A. (2007)**, Matric – induced autologous chondrocyte implantation (MACI(R)): Biological and histological assessment.

*Tissue Engineering Vol. 13 S. 737 – 746*

**Zhou R., Thomas D. H., Quao H., Bal H. S., Choi S. R., Alavi A., Ferrari V. A., Kung H. F., Acton P. D. (2005)**, In vivo detection of stem cells grafted in infarcted rat myocardium.

*Journal of Nuclear medicine Vol. 46/5 S. 816 – 822*

**Zhou G., Liu W., Cui L., Wang X., Liu T., Cao Y. (2006)**, Repair of Porcine Articular Osteochondral Defects in Non-Weightbearing Areas with Autologous Bone Marrow Stromal Cells.

*Tissue Engineering Vol. 12 S. 3209 – 3220*

**Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. (2001)**, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies.

*Tissue Engineering Vol. 7 S. 211 - 228*

## 9 Anhang

## 9.1 Tabellen zu Material und Methoden

## 9.1.1 Verwendete Stoffe

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>20GNL<sup>®</sup></b>	Amedix GmbH, Esslingen, Deutschland
<b>Accutase</b>	PAA, Pasching, Österreich
<b>Alkohol</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Aluminiumsulfat-18-Hydrat</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Bidest</b>	
<b>Bleicitrat</b>	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
<b>Bovines Serum Albumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Caco-Dylat Puffer</b>	Merck Schuhardt, Hohenbrunn, Deutschland
<b>ChondroFiller liquid<sup>®</sup></b>	Amedix GmbH, Esslingen, Deutschland
<b>Collagenase I</b>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<b>Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose</b>	Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland
<b>Endorem<sup>®</sup></b>	Guerbet, Sulzbach, Deutschland
<b>Epon</b>	Plano, Wetzlar, Deutschland
<b>Ethanol</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Eukitt</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Fetales Bovines Serum (FBS) Gold</b>	PAA, Pasching, Österreich
<b>Formaldehyd</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Formalin</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Glutaraldehyd</b>	Agar Scientific, Wetzlar, Deutschland
<b>Hoechst Farbstoff 33342</b>	Invitrogen, Deutschland
<b>HCl</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 9 Anhang

<b>Kaisersgelatine</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumhexacyanoferrat II (gelbes Blutlaugensalz)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Kernechtrot</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Kollagen-NF<sup>®</sup></b>	Amedix GmbH, Esslingen, Deutschland
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Osmium tetroxide OsO<sub>4</sub></b>	Plano, Wetzlar, Deutschland
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Penicillin/Streptomycin (P/S)</b>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<b>Phalloidin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Phosphate buffered saline (PBS)</b>	Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland
<b>Pikrinsäure</b>	Fluka Analytical, Steinheim, Deutschland
<b>Prolin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Pro Long Gold<sup>®</sup></b>	Invitrogen, Deutschland
<b>Richardson Färbelösung</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Sevofluran</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Sterofundin</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Tris - Base</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Uranylacetat</b>	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
<b>Xylol</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 9.1.2 Verwendete Materialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BD-Spitze 1ml</b>	Amedix GmbH, Esslingen, Deutschland
<b>Chamberslide System</b>	Thermo Fischer, Schwerte, Deutschland
<b>Culture - Insert</b>	Ibidi, Planegg / Martinsried, Deutschland
<b>Deckgläschen rund</b>	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
<b>Deckgläschen</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Eppendorfröhrchen 1,5 ml, 2 ml</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 9 Anhang

<b>Falconröhrchen, Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Filter 70 µm</b>	BD Falcon, Belgien
<b>Glaspetrischale</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Glaspipetten</b>	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
<b>Kanülen 18 G, 21G</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Kanüle Neobject 1,2 mm x 40 mm</b>	Dr. Junghans Medical GmbH, Bad Lausick, Deutschland
<b>Kanüle Sterican 2,1 mm x 80 mm</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Kryoröhrchen 1,5 ml</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
<b>Objektträger</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Petrischalen Glas</b>	Carl Roth KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Petrischalen Kunststoff</b>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Plastikpipette 10 ml</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
<b>Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl</b>	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml, 650 µl</b>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Single Use Adapter<sup>®</sup>, Schraubadapter</b>	Amedrix, Esslingen, Deutschland
<b>Singe Use Mixer<sup>®</sup>, Mischadapter</b>	Amedrix, Esslingen, Deutschland
<b>Skalpellklingen</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Spritze BD 1 ml</b>	Amedrix, Esslingen, Deutschland
<b>Spritzen 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Twin - Syringe Dispenser<sup>®</sup></b>	Amedrix, Esslingen, Deutschland
<b>Well Platten (6, 24, 96) - Zellkulturplatten</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

## 9 Anhang

### 9.1.3 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Aquariumheizer, thermocontrol 150 Watt	EHEIM GmbH u Co KG, Deizisau, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell 150	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator Sanyo CO2 Incubator	Sanyo, München, Deutschland
Cryo- Einfriergerät „Mr. Frosty“ Freezing Container	Nalgene über Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
C3 Oberflächenspule	Philips Medical System, Hamburg, Deutschland
Elektronenmikroskop 109	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Feinwaage „Discovery“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Observer 2.1	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank -86 °C Heraeus Herafreeze	Thermo Fischer Scientific, USA
Gyrosan Intera 1 Tesla, Magnetresonanztomograph	Phillips Medical System, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Lichtmikroskop Type 090135006	Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Deutschland
Life Cell imaging Apotome Observer 2.1	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Microplate reader Tecan Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikroskop Axio Observer Z1, Temp Module S, CO2 Module S	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrotom HM400	Microm GmbH, Walldorf Deutschland
Pipettus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Rüttler	Janke & Kunkel, IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sterilbank Zellkultur „MSC advantage“	Thermo Fischer Scientific, USA
Stickstofftank Thermolyne	Thermo Fischer Scientific, USA
TEM-Mikroskop EM 109	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut	Reichert, München, Deutschland

## 9 Anhang

Ultratrim	Reichert, München, Deutschland
Ultrostainer	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 11R Heraeus	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zylinder Bohrer, 5,6 mm	HSS Emil Lux GmbH u. Co. KG, Wermelskirchen, Deutschland

### 9.1.4 Verwendete Softwareprodukte

Softwareprodukt	Hersteller
Axiovision image analysis	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
ImageJ 1.48v	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office Excel	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Office Word	Microsoft Corporation, USA
OsiriX Imaging Software Version 4.1.2	Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz
Pixelmator 3.3.1 Limestone (41204)	Pixelmator Team, Vilnius, Litauen
View Forum R6.3V1L7 SP1 2010	Philips Medical Systems DMC GmbH, Hamburg, Deutschland
Xara Photo und Graphic Designer 9	Xara Group Ltd, England

## 9.2 Tabellen zu den Ergebnissen

### 9.2.1 Life Cell Imaging

#### 9.2.1.1 Einzelwerte 3 fach Messung Life Cell:

Bild	0	18	36	54	72	90	108	126	144
Zeit in h	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Hd 4/13 +E	32,584	30,247	24,668	17,341	9,914	3,615	1,23	0	0
Hd 4/13 +E	32,729	29,815	25,054	16,76	9,813	3,803	1,355	0	0
Hd 4/13 +E	32,349	30,202	24,997	16,888	9,97	3,762	1,202	0	0
Hd 4/13 -E	30,649	28,403	22,865	17,246	11,551	7,625	2,873	0,704	0
Hd 4/13 -E	31,115	28,312	23,179	17,71	11,56	8,178	3,024	0,858	0
Hd 4/13 -E	31,202	28,785	23,096	17,789	12,074	8,112	2,911	0,636	0
Hd 6/13+E	30,521	29,792	26,682	21,277	15,679	10,02	6,487	5,082	1,489
Hd 6/13+E	30,751	29,686	26,426	21,243	15,548	10,229	6,712	5,052	2,154
Hd 6/13+E	30,681	29,797	26,523	21,375	15,698	10,14	7,243	5,063	1,758
Hd 6/13 -E	32,427	30,717	25,553	21,117	16,169	10,569	7,024	4,496	3,817
Hd 6/13 -E	31,805	30,002	25,845	21,512	17,317	10,799	7,314	5,083	4,118
Hd 6/13 -E	32,35	30,759	25,922	21,452	17,362	11,049	7,419	4,388	3,569
Hd 7/13 +E	32,202	30,474	23,176	18,21	14,533	9,14	4,079	1,919	0
Hd 7/13 +E	32,735	29,988	23,235	18,196	14,723	10,329	5,1	2,474	0
Hd 7/13 +E	32,013	30,438	22,97	18,953	14,678	10,1	4,183	2,077	0
Hd 7/13 -E	33,766	32,618	29,062	23,398	19,694	13,439	10,818	5,487	3,07
Hd 7/13 -E	34,053	32,618	28,989	23,8	19,442	14,276	11,077	5,414	3,528
Hd 7/13 -E	33,007	32,689	29,356	23,748	20,053	14,789	10,842	5,657	3,638
Hd 11/13 +E	28,805	26,646	20,636	14,781	5,225	2,552	0,806	0	0
Hd 11/13 +E	28,574	26,739	20,188	14,28	4,733	2,997	0,82	0	0
Hd 11/13 +E	29,276	26,875	20,224	13,806	5,094	2,483	0,836	0	0
Hd 11/13 -E	27,965	26,828	21,635	17,271	11,944	4,453	1,733	1,066	0
Hd 11/13 -E	27,946	26,616	21,489	17,834	12,413	5,078	1,571	1,06	0
Hd 11/13 -E	28,584	26,655	22,291	18,1	12,376	5,418	1,614	1,42	0
Hd 16/13 +E	26,393	22,646	17,118	8,53	1,761	0	0	0	0
Hd 16/13 +E	25,797	22,962	16,665	8,936	1,885	0	0	0	0
Hd 16/13 +E	26,196	23,205	17,125	8,899	1,94	0	0	0	0
Hd 16/13 -E	32,186	28,354	22,551	14,368	8,51	3,755	0	0	0
Hd 16/13 -E	31,489	28,164	22,554	14,087	8,523	3,299	0	0	0
Hd 16/13 -E	31,942	28,29	22,757	14,201	8,532	3,382	0	0	0

Hd = Hund Stammzellprobe; + E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen

#### 9.2.1.2 Standardabweichungen der Mittelwerte, Life Cell Imaging

Hd 4/13 +E	0,157	0,194	0,170	0,249	0,065	0,081	0,067	0,000	0,000
Hd 4/13 -E	0,243	0,205	0,133	0,240	0,244	0,247	0,064	0,093	0,000
Hd 6/13+E	0,096	0,051	0,106	0,056	0,067	0,086	0,317	0,012	0,273
Hd 6/13 -E	0,277	0,347	0,159	0,174	0,552	0,196	0,167	0,305	0,224
Hd 7/13 +E	0,306	0,221	0,114	0,354	0,081	0,515	0,459	0,233	0,000
Hd 7/13 -E	0,441	0,033	0,159	0,179	0,251	0,556	0,117	0,102	0,246
Hd 11/13 +E	0,292	0,094	0,203	0,398	0,208	0,228	0,012	0,000	0,000
Hd 11/13 -E	0,296	0,092	0,349	0,346	0,213	0,400	0,069	0,168	0,000
Hd 16/13 +E	0,248	0,229	0,215	0,183	0,075	0,000	0,000	0,000	0,000
Hd 16/13 -E	0,289	0,079	0,096	0,115	0,009	0,198	0,000	0,000	0,000

Hd = Hund Stammzellprobe; + E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen

## 9 Anhang

### 9.2.1.3 Life Cell Imaging, normalisierte Werte in Prozent der frei Fläche

<b>Endorem</b>									
Zeit in h	0	3	6	9	12	15	18	21	24
<b>Hd 4/13</b>	100%	92%	77%	52%	30%	11%	4%	0%	0%
<b>Hd 6/13</b>	100%	97%	87%	69%	51%	33%	22%	17%	6%
<b>Hd 7/13</b>	100%	94%	72%	57%	45%	30%	14%	7%	0%
<b>Hd 11/13</b>	100%	93%	70%	49%	17%	9%	3%	0%	0%
<b>Hd 16/13</b>	100%	88%	65%	34%	7%	0%	0%	0%	0%
<b>ohne Endorem</b>									
Zeit in h	0	3	6	9	12	15	18	21	24
<b>Hd 4/13</b>	100%	92%	74%	57%	38%	26%	9%	2%	0%
<b>Hd 6/13</b>	100%	95%	80%	66%	53%	34%	23%	14%	12%
<b>Hd 7/13</b>	100%	97%	87%	70%	59%	42%	32%	16%	10%
<b>Hd 11/13</b>	100%	95%	77%	63%	43%	18%	6%	4%	0%
<b>Hd 16/13</b>	100%	89%	71%	45%	27%	11%	0%	0%	0%

Hd = Hund Stammzellprobe

### 9.2.1.4 Life Cell Imaging Halbwertszeit und Endzeit

alle Werte Fl.:	50%	0%
<b>Hd 16/13 +E</b>	7,5 h	15 h
<b>Hd 11/13 + E</b>	8,9 h	21 h
<b>Hd 4/13 + E</b>	9,3 h	21 h
<b>Hd 7/13 + E</b>	10,8 h	24 h
<b>Hd 6/13 + E</b>	12,2 h	
<b>Hd 16/13 - E</b>	8,3 h	18 h
<b>Hd 11/13 - E</b>	11,1 h	24 h
<b>Hd 4/13 - E</b>	10 h	24 h
<b>Hd 7/13 - E</b>	13,6 h	
<b>Hd 6/13 - E</b>	12,4 h	
<b>Mittelw.</b>	<b>10,4 h</b>	<b>21,0 h</b>
<b>Std. Abw.</b>	<b>1,9 h</b>	<b>3,2 h</b>

Hd = Hund Stammzellprobe; + E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen; Fl = Fläche;

Mittelw. = Mittelwert; Std. Abw. = Standardabweichung; h = Stunden

## 9 Anhang

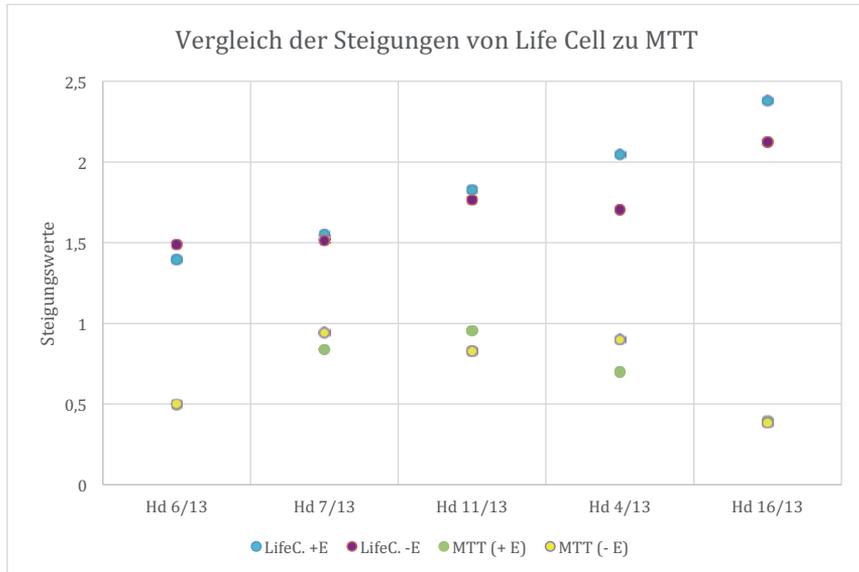
### 9.2.1.5 Halbwertszeit und komplette Besiedlung, + E und - E, Life Cell Imaging

+ E frei Fl.:	50%	0%	- E frei Fl.:	50%	0%
Hd 16/13	7,5 h	15 h	Hd 16/13	8,3 h	18 h
Hd 11/13	8,9 h	21 h	Hd 11/13	11,1 h	24 h
Hd 4/13	9,3 h	21 h	Hd 4/13	10 h	24 h
Hd 7/13	10,8 h	24 h	Hd 7/13	13,6 h	
Hd 6/13	12,2 h		Hd 6/13	12,4 h	
<b>Mittelw.</b>	<b>9,7 h</b>	<b>20,3 h</b>	<b>Mittelw.</b>	<b>11,1 h</b>	<b>22,0 h</b>
<b>Std. Abw.</b>	<b>1,6 h</b>	<b>3,3 h</b>	<b>Std A</b>	<b>1,8 h</b>	<b>2,8 h</b>

Hd = Hund Stammzellprobe; + E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen; Fl = Fläche; Mittelw. = Mittelwert; Std. Abw. = Standardabweichung; h = Stunden

### 9.2.2 Vergleich Life Cell Imaging mit MTT Test

#### 9.2.2.1 Grafik Vergleich der Steigungen, Life Cell Imaging zu MTT Test



Hd = Hund Stammzellprobe; + E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen; LifeC. = Life Cell Imaging

## 9 Anhang

### 9.2.2.2 Proliferationskapazität m im Vergleich

Life Cell (LC)	Life Cell m <sub>+E</sub>	Life Cell m <sub>-E</sub>	MTT m <sub>+E</sub>	MTT m <sub>-E</sub>
Hd 6/13	1,3971	1,4894	0,4941	0,4991
Hd 7/13	1,5521	1,5154	0,8353	0,943
Hd 11/13	1,8281	1,7665	0,9542	0,8276
Hd 4/13	2,0454	1,7038	0,6977	0,9012
Hd 16/13	2,3803	2,1227	0,3954	0,3858

#### Pearson Korrelationskoeffizienten:

LC (+ E) zu LC (- E) 0,94

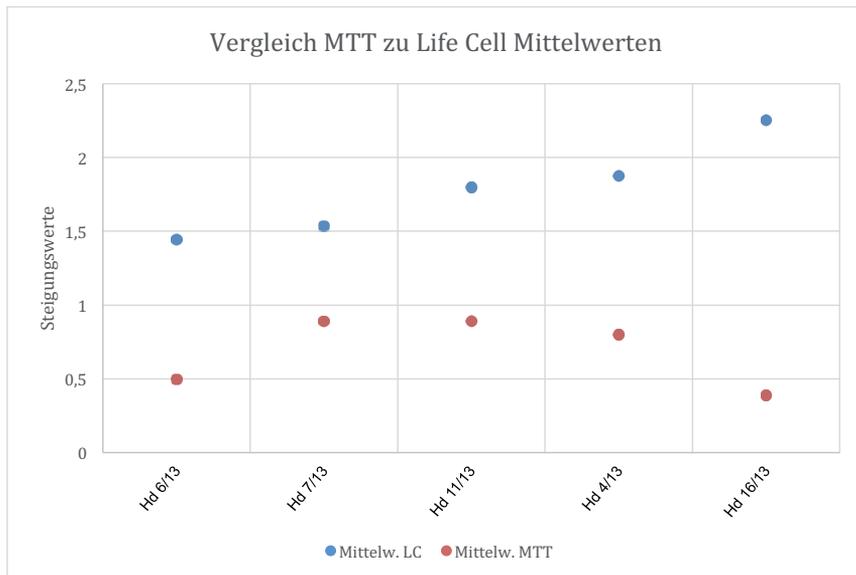
LC (+ E) zu MTT (+ E) -0,32

LC (- E) zu MTT (- E) -0,50

MTT (+ E) zu MTT (- E) 0,87

Hd = Hund Stammzellprobe; + E = Endorem® markierte Zellen; - E = nicht Endorem® markierte Zellen; LC = Life Cell Imaging; m = Proliferationskapazität (Steigung)

### 9.2.2.3 Grafik Vergleich MTT zu Life Cell Imaging (Mittelwerte)



Hd = Hund Stammzellprobe; Mittelw. = Mittelwert; LC = Life Cell Imaging

## 9 Anhang

### 9.2.2.4 Vergleich der Proliferationskapazitäten m (Steigungen) (unabhängig von + E / - E)

	<b>Mittelw. LC</b>	<b>Mittelw. MTT</b>
<b>Hd 6/13</b>	1,44325	0,4966
<b>Hd 7/13</b>	1,53375	0,88915
<b>Hd 11/13</b>	1,7973	0,8909
<b>Hd 4/13</b>	1,8746	0,79945
<b>Hd 16/13</b>	2,2515	0,3906

Hd = Hund Stammzellprobe; Mittelw. = Mittelwert; LC = Life Cell Imaging

## 9 Anhang

### 9.2.3 MRT

#### 9.2.3.1 Daten Defektlokalisierung, Lufteingüsse

Knie Nr.	Konz	Defektlokalisierung		Luftblasen
		T2* FFE sag 1 kran	T2 TSE dors 1 med	
1	0,00	2	1	2
1	0,00	2	1	2
3	0,00	2	1,5	0
3	0,00	2,25	1,75	0
12	0,00	2	1	2
12	0,00	2	1	2
14	0,00	1,75	1,75	2
14	0,00	1,75	1,75	2
18	0,00	2	1	0
18	0,00	2	1	0
9	0,50	2	1,5	0
9	0,50	2	1,25	0
16	0,50	1,75	1,5	2
16	0,50	1,5	1,5	2
17	0,50	2	1,25	1
17	0,50	2	1	0
19	0,50	2	1,75	0
19	0,50	2	1,5	0
20	0,50	1,5	1,5	0
20	0,50	1,5	1,5	0
4	4,75	2	1,25	0
4	4,75	2	1,5	0
10	4,75	2	1,75	0
10	4,75	2	1,5	2
13	4,75	1,75	1,5	0
13	4,75	1,75	1,5	2
22	4,75	2	1	2
22	4,75	2	1	2
23	4,75	2	1,5	2
23	4,75	2	1,5	0
2	10,00	2	1,5	0
2	10,00	2	1,25	2
11	10,00	2	1,75	2
11	10,00	1,75	1,75	2
15	10,00	1,75	1,5	1
15	10,00	2	1,25	2
21	10,00	2	1,25	1
21	10,00	2	1,25	0
24	10,00	2	1,5	2
24	10,00	1,75	1,5	2
	Mittelw.	1,919	1,388	
	Stand.Abw.	0,162	0,256	

## 9 Anhang

9.2.3.2 MRT, Signalintensität ROI, Mittelwerte und Standardabweichungen für alle objektiven Messungen,

<b>Konz</b>	<b>Mean T1</b>	<b>SDEV T1</b>	<b>Mean T2* k</b>	<b>SDEV T2* k</b>	<b>Mean T2* l</b>	<b>SDEV T2* l</b>	<b>Mean T2 TSE</b>	<b>SDEV T2 TSE</b>
<b>0,00</b>	13,00	3,98	65,15	22,83	65,33	17,87	30,96	8,92
<b>0,50</b>	13,68	2,35	62,55	34,92	46,83	31,05	37,66	6,34
<b>4,75</b>	15,79	5,14	81,15	46,04	67,13	34,02	31,93	13,71
<b>10,00</b>	12,75	5,71	72,09	27,56	51,97	22,88	33,01	8,45

MRT = Magnetresonanztomographie; ROI = Region of Interest; Konz = Konzentration Zellen im Defekt; Mean = Mittelwert; SDEV = Standardabweichung; k = kurz (3 mm Schnitt), l = lang (2mm Schnitt)

9.2.3.3 Ergebnisse des Student – t - Test und Pearson Korrelationstest

	<b>T1</b>	<b>T2* 3mm</b>	<b>T2* 2mm</b>	<b>T2 TSE</b>
<b>p-Werte</b>	0,32	0,14	0,16	0,20
<b>Pearsson Korrelation</b>	-0,06	0,57	-0,14	-0,21

T1 = T1 – gewichtete Aufnahmen; T2 = T2 gewichtetet Aufnahmen; TSE = Turbo Spin Echo; mm = Millimeter

## 9 Anhang

### 9.2.3.4 Messwerte objektiv

#### a – T2\* FFE (2 mm)

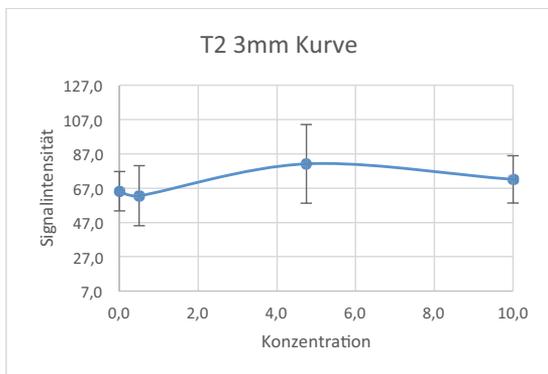
	Konz	Defektgröße							Aussenbereich					1. Normierung CNR Area/Aussen
		T2 FFE lang			Sum	Min	Max	Length	Mean	Sdev	Sum	Min	Max	
Area	Mean	Sdev	Area	Mean										Sdev
1	0,00	0,086	694,125	389,006	27765,000	83,000	1425,000	1,092	13,564	4,483	529,000	0,000	23,000	51,174
1	0,00	0,129	494,763	413,514	29191,000	18,000	1425,000	1,425	12,982	2,800	740,000	7,000	20,000	38,111
3	0,00	0,102	692,149	386,139	32531,000	11,000	1305,000	1,300	9,435	5,576	434,000	0,000	25,000	73,360
3	0,00	0,078	816,763	312,776	31037,000	124,000	1305,000	1,173	10,842	6,852	412,000	0,000	25,000	75,333
12	0,00	0,107	787,980	260,285	39399,000	136,000	1181,000	1,264	11,080	6,404	554,000	0,000	26,000	71,117
12	0,00	0,148	712,849	312,405	47048,000	109,000	1291,000	1,488	13,269	7,153	889,000	0,000	38,000	53,723
14	0,00	0,144	1195,075	289,305	80070,000	451,000	1686,000	1,456	12,313	4,493	825,000	2,000	25,000	97,058
14	0,00	0,148	1122,000	361,814	83028,000	90,000	1686,000	1,493	13,843	6,704	969,000	0,000	36,000	81,052
18	0,00	0,134	1565,319	663,722	100174,000	176,000	2654,000	1,455	26,290	11,853	1630,000	6,000	80,000	59,540
18	0,00	0,132	1616,742	615,251	100238,000	287,000	2654,000	1,457	34,000	18,000	204,000	1,000	51,000	47,551
9	0,50	0,173	524,343	260,994	36704,000	23,000	1234,000	1,675	13,671	6,214	998,000	0,000	34,000	38,354
9	0,50	0,153	850,138	470,890	55259,000	23,000	2046,000	1,529	15,369	2,247	999,000	11,000	21,000	55,315
16	0,50	0,137	240,382	184,529	16346,000	21,000	827,000	1,528	13,397	9,024	911,000	0,000	39,000	17,943
16	0,50	0,100	568,953	351,822	24465,000	24,000	1315,000	1,363	16,240	8,506	812,000	0,000	38,000	35,034
17	0,50	0,140	266,088	195,424	18094,000	22,000	771,000	1,630	11,375	4,955	728,000	0,000	24,000	23,392
17	0,50	0,144	310,206	195,852	21094,000	50,000	791,000	1,563	11,456	2,154	779,000	6,000	18,000	27,078
19	0,50	0,148	1940,124	600,120	137749,000	596,073	2810,343	1,601	23,496	13,931	1668,000	0,000	58,007	82,573
19	0,50	0,128	2012,277	592,551	128786,000	354,043	2810,343	1,518	23,905	12,333	1458,000	0,000	74,009	84,178
20	0,50	0,095	938,781	435,225	38490,000	307,000	1662,000	1,346	9,083	4,780	436,000	0,000	21,000	103,356
20	0,50	0,109	796,909	458,540	43830,000	133,000	1662,000	1,393	9,373	4,737	478,000	0,000	21,000	85,022
4	4,75	0,134	1130,821	465,137	63326,000	191,000	2178,000	1,537	14,508	3,369	914,000	7,000	22,000	77,945
4	4,75	0,119	629,711	234,032	28337,000	141,000	1134,000	1,491	5,429	4,435	266,000	0,000	19,000	115,990
10	4,75	0,182	683,161	513,013	59435,000	44,000	1677,000	1,723	12,129	2,501	1031,000	8,000	21,000	56,325
10	4,75	0,144	1224,030	395,048	80786,000	308,000	1730,000	1,677	11,603	2,798	847,000	9,000	22,000	105,493
13	4,75	0,186	623,524	368,360	39282,000	28,000	1232,000	1,661	12,645	4,764	784,000	2,000	26,000	49,310
13	4,75	0,161	676,382	368,957	37201,000	28,000	1232,000	1,596	13,000	4,556	702,000	3,000	26,000	52,029
22	4,75	0,094	759,184	416,589	28849,000	112,000	2250,000	1,232	22,357	9,114	939,000	4,000	57,000	33,957
22	4,75	0,103	897,176	466,506	45756,000	112,000	2250,000	1,310	20,259	5,851	1094,000	10,000	35,000	44,285
23	4,75	0,144	1700,500	543,183	102030,000	192,000	2442,000	1,526	12,754	3,787	829,000	3,000	27,000	133,331
23	4,75	0,156	1559,339	598,921	96679,000	192,000	2442,000	1,569	17,239	6,639	795,000	16,000	19,000	90,454
2	10,00	0,156	266,894	142,705	17615,000	30,000	674,000	1,601	10,773	4,610	711,000	1,000	23,000	24,774
2	10,00	0,174	272,127	139,331	21498,000	43,000	574,000	1,588	8,671	3,344	659,000	2,000	27,000	31,384
11	10,00	0,134	1320,302	606,145	83179,000	205,000	2420,000	1,648	17,185	5,327	1117,000	6,000	35,000	76,829
11	10,00	0,155	1209,597	651,617	87091,000	101,000	2420,000	1,645	17,151	5,804	1252,000	8,000	38,000	70,526
15	10,00	0,128	708,274	367,890	43913,000	112,000	1392,000	1,451	14,081	7,523	875,000	0,000	31,000	50,300
15	10,00	0,114	775,782	332,485	42668,000	64,000	1392,000	1,396	14,464	6,327	810,000	2,000	29,000	53,635
21	10,00	0,176	685,494	363,159	54154,000	7,000	1799,000	1,599	22,282	10,347	1738,000	0,000	55,000	30,764
21	10,00	0,165	937,883	405,871	72217,000	7,000	1928,000	1,544	22,437	6,977	1593,000	13,000	49,000	41,801
24	10,00	0,126	1804,066	595,101	110048,000	265,000	2613,000	1,505	22,885	13,528	1396,000	0,000	58,000	78,832
24	10,00	0,110	1913,346	467,547	99494,000	605,000	2613,000	1,403	21,444	12,014	1158,000	0,000	52,000	89,225
		<b>Mittelwert</b>	<b>0,135</b>											
		<b>Stand.Abw</b>	<b>0,027</b>											

## 9 Anhang

### b – T2\* FFE (3 mm) Rohdaten objektive Messung

Knie Nr.	Konz	Defektgröße						Aussehbereich						1. Normierung	
		T2 FFE kurz												CNR	Area/Aussen
		Area	Mean	Sdev	Sum	Min	Max	Length	Mean	Sdev	Sum	Min	Max		
1	0,00	0,088	675,861	329,112	24331,000	113,000	1298,000	1,092	10,162	4,375	376,000	0,000	20,000		66,509
1	0,00	0,171	424,431	383,157	21646,000	17,000	1310,000	1,654	12,842	2,776	732,000	8,000	22,000		33,050
3	0,00	0,135	586,885	361,337	30518,000	26,000	1239,000	1,486	7,865	3,565	409,000	0,000	18,000		74,620
3	0,00	0,101	737,825	285,425	29513,000	226,000	1239,000	1,232	10,732	5,230	440,000	0,000	21,000		68,750
12	0,00	0,177	489,912	296,046	33314,000	17,000	1054,000	1,528	10,382	4,875	706,000	0,000	27,000		47,189
12	0,00	0,202	409,774	311,260	25406,000	7,000	1027,000	1,744	9,767	4,948	586,000	0,000	23,000		41,955
14	0,00	0,130	1112,571	260,034	62304,000	405,000	1501,000	1,462	10,569	5,364	613,000	1,000	29,000		105,267
14	0,00	0,151	1233,804	427,565	629245,000	215,000	1905,000	1,507	13,625	5,987	218,000	8,000	33,000		90,554
18	0,00	0,127	1444,837	625,611	62128,000	416,000	2501,000	1,442	22,652	9,987	1042,000	0,000	52,000		63,784
18	0,00	0,144	1244,510	583,784	63470,000	130,000	2128,000	1,464	28,562	10,330	914,000	10,000	55,000		43,572
9	0,50	0,133	569,312	234,388	27327,000	213,000	1158,000	1,501	11,229	5,478	539,000	2,000	26,000		50,700
9	0,50	0,131	885,167	466,401	37177,000	202,000	1786,000	1,418	11,023	3,061	485,000	4,000	15,000		80,302
16	0,50	0,100	410,162	261,790	15176,000	86,000	1060,000	1,356	12,711	6,706	483,000	0,000	26,000		32,268
16	0,50	0,136	502,000	286,598	24096,000	42,000	1379,000	1,480	19,156	9,584	862,000	3,000	44,000		26,206
17	0,50	0,160	319,400	186,804	15970,000	17,000	757,000	1,587	13,356	7,467	788,000	1,000	34,000		23,914
17	0,50	0,172	386,435	226,644	23959,000	17,000	1032,000	1,666	9,571	5,288	536,000	0,000	25,000		40,376
19	0,50	0,134	1287,824	618,944	61816,000	204,025	2296,280	1,590	17,308	11,880	848,000	0,000	54,007		74,406
19	0,50	0,132	1898,239	718,775	87319,000	131,000	2872,000	1,602	19,413	9,921	893,000	0,000	39,000		97,782
20	0,50	0,098	762,125	282,603	24388,000	362,000	1293,000	1,337	5,957	3,393	274,000	0,000	14,000		127,938
20	0,50	0,115	1331,714	591,835	46610,000	328,000	2287,000	1,423	15,073	4,997	618,000	8,000	31,000		88,351
4	4,75	0,109	974,690	484,056	34114,000	194,024	1844,225	1,320	14,296	8,783	486,000	0,000	34,004		68,179
4	4,75	0,133	1255,743	618,340	48974,000	164,020	2478,202	1,631	13,906	3,875	584,000	10,001	32,004		90,302
10	4,75	0,263	605,925	470,884	48474,000	25,000	1490,000	1,987	8,416	4,447	648,000	0,000	20,000		71,997
10	4,75	0,116	1182,767	304,301	50859,000	476,000	1736,000	1,546	7,548	3,437	317,000	1,000	17,000		156,699
13	4,75														
13	4,75														
22	4,75	0,179	338,467	223,645	20308,000	3,000	865,000	1,653	13,918	9,292	849,000	0,000	39,000		24,319
22	4,75	0,127	386,081	259,248	14285,000	3,000	1107,000	1,400	12,343	7,033	432,000	0,000	31,000		31,279
23	4,75	0,119	1364,735	365,622	66872,000	529,000	1974,000	1,350	12,545	2,791	552,000	8,000	20,000		108,787
23	4,75	0,145	1504,217	588,148	69194,000	319,000	2257,000	1,521	11,511	4,872	541,000	0,000	28,000		130,676
2	10,00	0,161	303,959	196,544	14894,000	36,000	1035,000	1,676	14,136	4,306	622,000	4,000	22,000		21,502
2	10,00	0,119	256,861	172,399	9247,000	36,000	774,000	1,487	14,265	1,563	485,000	11,000	17,000		18,006
11	10,00	0,130	993,711	488,846	44717,000	130,000	1899,000	1,513	11,478	5,085	528,000	1,000	24,000		86,575
11	10,00	0,133	974,957	492,315	45823,000	130,000	1899,000	1,573	11,286	5,401	553,000	0,000	24,000		86,386
15	10,00	0,107	1116,381	430,643	54703,000	394,048	1948,238	1,368	15,794	7,303	758,000	0,000	34,004		70,684
15	10,00	0,116	1083,359	468,917	47668,000	156,019	1896,231	1,422	14,739	10,011	560,000	0,000	40,005		73,503
21	10,00	0,204	525,068	328,259	30979,000	36,000	1419,000	1,792	17,230	9,278	1051,000	0,000	45,000		30,474
21	10,00	0,171	813,036	454,891	45530,000	147,000	1752,000	1,614	17,132	9,325	908,000	0,000	45,000		47,457
24	10,00	0,102	1244,308	618,330	48528,000	77,000	2302,000	1,387	16,568	7,661	613,000	0,000	39,000		75,103
24	10,00	0,096	1234,973	652,392	45694,000	77,000	2302,000	1,348	14,486	6,623	536,000	1,000	36,000		85,253
		<b>Mittelwert</b>	<b>0,139</b>												
		<b>Stand.Abw</b>	<b>0,035</b>												

Graphik der normierten T2\* FFE (3 mm), Signalintensitäten - Kurve, objektive Messung

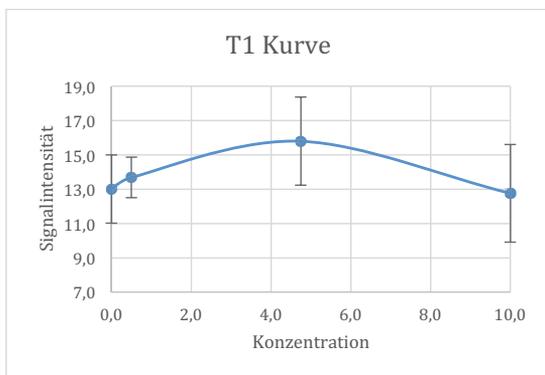


## 9 Anhang

### c – T1 Rohdaten objektive Messung

Knie Nr.	Konz	Defektgröße								Aussenbereich					1. Normierung	
		T1				Length	Mean	Sdev	Sum	Min	Max	CNR	Area/Aussen			
		Area	Mean	Sdev	Sum											
1	0,00	0,137	956,245	289,503	104231,000	336,041	1672,204	1,402	78,309	43,399	8379,000	4,000	190,023	12,211		
1	0,00	0,156	947,937	266,396	116596,000	336,041	1672,204	1,545	72,372	43,018	8757,000	0,000	178,022	13,098		
3	0,00	0,095	791,110	159,159	60915,000	410,050	1102,135	1,204	39,802	27,749	3144,000	0,000	112,014	19,876		
3	0,00	0,063	782,968	130,090	43063,000	532,065	1040,127	1,072	35,189	23,483	1900,000	0,000	100,012	22,250		
12	0,00	0,268	789,496	230,344	165794,000	270,033	1518,185	1,906	76,311	44,376	16178,000	0,000	208,025	10,346		
12	0,00	0,180	767,358	190,478	110500,000	278,034	1420,173	1,576	72,379	40,946	10567,000	0,000	190,023	10,602		
14	0,00	0,137	763,128	205,157	88523,000	228,028	1146,140	1,460	57,357	32,745	6711,000	0,000	140,017	13,305		
14	0,00	0,132	788,591	201,239	82802,000	228,028	1426,174	1,443	59,531	33,833	6251,000	0,000	152,019	13,247		
18	0,00	0,159	227,891	63,246	31221,000	85,000	451,000	1,878	20,685	11,630	2958,000	0,000	59,000	11,017		
18	0,00	0,130	255,402	95,631	28605,000	151,000	656,000	1,320	19,791	11,418	2276,000	0,000	52,000	12,905		
9	0,50	0,154	421,185	99,119	53491,000	150,018	692,084	1,527	26,680	16,997	3388,000	0,000	76,009	15,787		
9	0,50	0,144	424,382	94,659	48804,000	150,018	808,099	1,472	29,543	15,951	3338,000	0,000	70,009	14,365		
16	0,50	0,130	245,465	69,343	24301,000	86,000	378,000	1,503	23,704	14,132	2323,000	2,000	77,000	10,355		
16	0,50	0,154	179,138	119,925	22034,000	0,000	542,000	1,547	21,828	12,535	2663,000	0,000	54,000	8,207		
17	0,50	0,201	994,309	416,205	172015,000	308,056	2220,406	1,763	78,400	50,078	130,140	0,000	300,055	12,683		
17	0,50	0,161	910,386	430,166	124723,000	308,056	2768,507	1,688	70,087	40,378	9462,000	0,000	172,031	12,989		
19	0,50	0,155	1227,889	228,703	169449,000	266,032	1796,219	1,699	81,809	55,326	11371,000	0,000	292,036	15,009		
19	0,50	0,182	1290,183	210,921	201269,000	736,090	1778,217	1,758	89,624	55,300	13892,000	0,000	298,036	14,396		
20	0,50	0,133	900,906	201,483	97298,000	214,026	1506,184	1,517	59,771	35,335	6575,000	0,000	186,023	15,073		
20	0,50	0,123	893,335	142,763	83080,000	454,055	1452,177	1,525	69,437	37,617	6319,000	0,000	172,021	12,865		
4	4,75	0,093	381,066	69,800	28961,000	202,000	589,000	1,324	21,618	13,475	1643,000	0,000	65,000	17,627		
4	4,75	0,126	378,042	78,801	36292,000	195,000	607,000	1,483	22,383	11,445	2104,000	0,000	56,000	16,890		
10	4,75	0,158	1346,548	305,968	187170,000	696,127	2604,477	1,652	81,815	45,134	11454,000	0,000	208,038	16,458		
10	4,75	0,107	1304,119	286,159	130412,000	728,133	2292,420	1,438	86,256	56,336	8626,000	0,000	288,053	15,119		
13	4,75	0,153	215,170	55,632	29048,000	41,000	388,000	1,498	16,296	11,158	2200,000	0,000	57,000	13,204		
13	4,75	0,133	228,553	41,508	26055,000	77,000	373,000	1,360	16,088	11,140	1818,000	0,000	57,000	14,206		
22	4,75	0,170	171,402	41,533	22625,000	40,000	270,000	1,605	16,530	9,577	2215,000	0,000	45,000	10,369		
22	4,75	0,152	171,931	40,311	19944,000	40,000	251,000	1,541	17,336	10,198	2115,000	0,000	42,000	9,918		
23	4,75	0,127	279,531	50,750	27394,000	140,000	451,000	1,529	12,042	6,779	1156,000	0,000	39,000	23,213		
23	4,75	0,143	290,460	58,739	36017,000	117,000	451,000	1,562	11,125	7,177	1246,000	0,000	31,000	26,109		
2	10,00	0,083	654,232	238,572	45142,000	268,000	1326,000	1,181	21,809	12,774	1483,000	0,000	71,000	29,998		
2	10,00	0,180	306,755	157,222	47547,000	49,000	1002,000	1,613	22,813	13,305	3536,000	0,000	72,000	13,446		
11	10,00	0,111	251,861	61,887	25438,000	120,000	383,000	1,333	20,919	10,684	2071,000	0,000	65,000	12,040		
11	10,00	0,148	265,355	55,257	32904,000	152,000	383,000	1,573	17,244	10,837	2121,000	0,000	50,000	15,388		
15	10,00	0,136	256,648	734,771	266921,000	800,171	5129,096	1,439	166,690	101,895	17836,000	0,000	512,109	15,397		
15	10,00	0,143	2707,667	675,298	308674,000	904,193	5129,096	1,505	226,548	131,025	25373,000	24,005	640,137	11,952		
21	10,00	0,197	1191,431	262,163	183480,000	538,066	2280,278	1,745	118,041	66,258	18060,000	0,000	388,047	10,093		
21	10,00	0,219	1210,475	292,597	206991,000	538,066	2648,323	1,796	109,455	63,220	18826,000	0,000	314,038	11,059		
24	10,00	0,165	311,865	60,724	43973,000	118,000	422,000	1,665	20,451	13,408	2904,000	0,000	62,000	15,249		
24	10,00	0,114	311,158	61,778	31427,000	143,000	419,000	1,451	25,800	13,828	2709,000	0,000	67,000	12,660		
Mittelwert		0,146														
Stand.Abw		0,037														

Graphik der normierten T1 Signalintensitäten - Kurve, objektive Messung

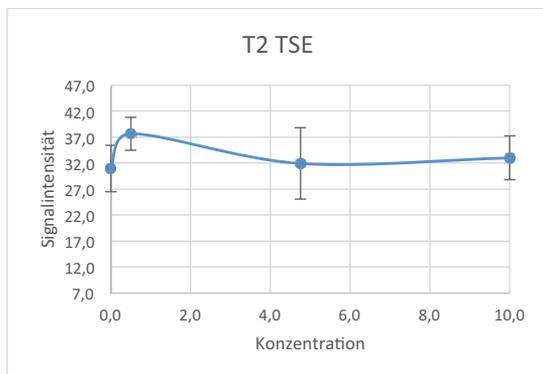


## 9 Anhang

### d – T2 TSE Rohdaten objektive Messung

	Konz	Defektgröße						Ausseubereich						1. Normierung	
		T2 TSE												CNR	Area/Aussen
		Area	Mean	Sdev	Sum	Min	Max	Length	Mean	Sdev	Sum	Min	Max		
1	0,00	0,146	546,732	180,604	10052,000	116,000	900,000	1,566	25,097	24,055	4643,000	0,000	95,000		21,785
1	0,00	0,135	580,661	164,060	99293,000	175,000	900,000	1,455	19,536	18,886	3282,000	0,000	87,000		29,723
3	0,00	0,086	606,196	108,051	64863,000	313,000	789,000	1,254	20,591	13,989	2265,000	0,000	49,000		29,440
3	0,00	0,099	581,206	126,944	73232,000	284,000	789,000	1,317	15,400	11,335	1925,000	0,000	41,000		37,741
12	0,00	0,119	756,713	230,816	118804,000	13,000	1080,000	1,459	18,714	19,849	2882,000	0,000	90,000		40,436
12	0,00	0,108	792,908	199,829	112593,000	274,000	1080,000	1,467	16,972	15,685	2393,000	0,000	62,000		46,719
14	0,00	0,109	708,993	149,593	98550,000	275,000	996,000	1,458	22,014	16,546	3038,000	0,000	70,000		32,206
14	0,00	0,137	693,276	173,611	117857,000	64,000	996,000	1,561	17,708	14,287	3028,000	0,000	66,000		39,150
18	0,00	0,118	684,646	200,558	110228,000	87,000	970,000	1,446	34,575	31,949	5532,000	0,000	120,000		19,802
18	0,00	0,137	659,989	203,214	124738,000	133,000	970,000	1,549	28,576	28,395	5258,000	0,000	133,000		23,096
9	0,50	0,164	756,766	180,000	168002,000	240,000	1124,000	1,696	31,823	27,388	7001,000	0,000	138,000		23,780
9	0,50	0,157	823,493	128,771	173757,000	439,000	1124,000	1,580	26,447	22,610	5501,000	0,000	94,000		31,137
16	0,50	0,173	545,852	173,913	125546,000	160,000	1031,000	1,653	18,173	19,626	4198,000	0,000	107,000		30,036
16	0,50	0,143	560,503	185,378	107056,000	155,000	1031,000	1,565	15,227	15,700	2954,000	0,000	69,000		36,810
17	0,50	0,147	618,665	269,009	110741,000	98,000	1335,000	1,687	16,023	15,502	2836,000	0,000	70,000		38,611
17	0,50	0,130	839,329	390,201	137650,000	31,000	2151,000	1,370	18,178	17,063	3072,000	0,000	66,000		46,173
19	0,50	0,162	997,918	221,205	194594,000	295,000	1346,000	1,698	27,751	25,263	5578,000	0,000	110,000		35,960
19	0,50	0,141	1040,576	201,618	176988,000	295,000	1346,000	1,614	26,491	23,894	4583,000	0,000	89,000		39,280
20	0,50	0,123	870,818	139,949	134106,000	436,000	1108,000	1,486	21,217	15,779	3225,000	0,000	65,000		41,043
20	0,50	0,139	773,422	208,310	133802,000	153,000	1148,000	1,519	20,087	18,410	3455,000	0,000	89,000		38,504
4	4,75	0,097	808,584	137,893	110776,000	508,000	1106,000	1,402	25,793	22,045	3611,000	0,000	83,000		31,349
4	4,75	0,109	789,822	144,507	124002,000	429,000	1106,000	1,492	19,458	21,271	3016,000	0,000	86,000		40,591
10	4,75	0,177	604,121	123,763	134719,000	273,000	813,000	1,666	18,693	15,540	4318,000	0,000	73,000		32,318
10	4,75	0,161	639,441	94,520	129161,000	311,000	797,000	1,628	18,859	15,457	3734,000	0,000	68,000		33,906
13	4,75	0,177	483,000	96,188	131988,000	258,000	708,000	1,707	16,591	14,758	3932,000	0,000	62,000		29,112
13	4,75	0,163	500,140	90,480	110531,000	168,000	708,000	1,685	20,124	15,911	4528,000	0,000	86,000		24,853
22	4,75	0,188	662,508	189,456	169602,000	95,000	984,000	1,725	34,806	35,914	8771,000	0,000	171,000		19,034
22	4,75	0,129	722,046	139,662	126358,000	329,000	984,000	1,537	22,888	23,321	4097,000	0,000	92,000		31,547
23	4,75	0,095	1013,292	174,897	131728,000	583,000	1414,000	1,301	14,496	15,321	1928,000	0,000	65,000		69,901
23	4,75	0,126	938,776	251,896	163347,000	207,000	1414,000	1,487	24,063	22,437	4211,000	0,000	103,000		39,013
2	10,00	0,113	761,108	269,627	120255,000	130,000	1331,000	1,471	20,062	18,140	3230,000	0,000	67,000		37,938
2	10,00	0,155	756,766	266,624	145685,000	122,000	1331,000	1,625	28,010	26,246	5350,000	0,000	110,000		27,375
11	10,00	0,090	759,323	179,018	98712,000	363,000	1141,000	1409,000	30,391	25,618	3890,000	0,000	117,000		24,985
11	10,00	0,136	735,695	201,726	137575,000	190,000	1141,000	1,591	15,204	16,738	2828,000	0,000	71,000		48,388
15	10,00	0,120	674,285	146,845	101817,000	276,000	954,000	1,451	17,392	17,231	2574,000	0,000	77,000		38,770
15	10,00	0,148	704,931	147,703	132527,000	37,000	979,000	1,617	21,043	19,175	3935,000	0,000	77,000		33,500
21	10,00	0,172	514,160	120,071	109516,000	220,000	719,000	1,624	22,836	20,393	4864,000	0,000	81,000		22,515
21	10,00	0,177	526,409	120,813	115810,000	233,000	719,000	1,623	25,256	22,240	5531,000	0,000	85,000		20,843
24	10,00	0,132	760,763	361,799	134655,000	0,000	1378,000	1,566	22,226	19,713	3934,000	0,000	88,000		34,229
24	10,00	0,160	738,507	351,808	154348,000	0,000	1378,000	1,592	22,707	23,711	4723,000	0,000	97,000		32,523
	<b>Mittelwert</b>	<b>0,137</b>													
	<b>Stand.Abw</b>	<b>0,027</b>													

Graphik der normierten T2 TSE, Signalintensitäten - Kurve, objektive Messung



## 9 Anhang

### e - T2 WATS Rohdaten objektive Messung

	Konz	Defektgröße										Aussenbereich			1. Normierung	
		T2 WATS										Mean	Sdev	Sum	Min	Max
		Area	Mean	Sdev	Sum	Min	Max	Mean	Sdev	Sum	Min	Max				
1	0,00	0,241	1063,407	408,019	91453,000	161,000	1987,000	28,524	16,947	2396,000	0,000	76,000		37,281		
1	0,00	0,261	1011,878	490,406	91069,000	176,000	2202,000	32,750	17,587	3013,000	2,000	93,000		30,897		
3	0,00	0,161	1004,407	454,307	59260,000	169,000	2003,000	26,190	16,400	1519,000	1,000	68,000		38,351		
3	0,00	0,176	940,462	329,652	61130,000	252,000	1653,000	26,574	14,037	1621,000	2,000	59,000		35,390		
12	0,00	0,259	727,543	329,656	66934,000	19,000	1359,000	22,582	14,474	2055,000	0,000	68,000		32,218		
12	0,00	0,276	711,479	332,505	68302,000	19,000	1359,000	20,402	13,321	1979,000	0,000	68,000		34,873		
14	0,00	0,228	836,463	362,953	68590,000	153,000	1369,000	15,679	8,844	1270,000	0,000	42,000		53,349		
14	0,00	0,303	725,942	402,435	75498,000	42,000	1369,000	16,096	9,050	1674,000	0,000	44,000		45,101		
18	0,00	0,245	1021,849	405,024	87879,000	167,000	1861,000	32,736	21,072	2848,000	1,000	99,000		31,215		
18	0,00	0,309	958,596	404,091	99694,000	167,000	1861,000	27,627	15,688	3039,000	1,000	70,000		34,698		
9	0,50	0,329	986,911	485,054	110534,000	97,000	2145,000	25,568	13,315	2838,000	0,000	68,000		38,599		
9	0,50	0,296	1014,437	488,998	104487,000	118,000	2145,000	26,635	13,122	2770,000	0,000	57,000		38,087		
16	0,50	0,303	478,154	292,374	49728,000	40,005	1316,161	47,016	29,122	4655,000	0,000	128,016		10,170		
16	0,50	0,397	440,246	398,810	58993,000	28,000	1826,000	48,158	28,118	6405,000	0,000	149,000		9,142		
17	0,50	0,470	155,887	154,271	24786,000	2,000	985,000	23,697	12,775	3602,000	0,000	58,000		6,578		
17	0,50	0,635	211,841	195,414	44063,000	2,000	985,000	22,536	13,377	4665,000	0,000	62,000		9,400		
19	0,50	0,359	1011,608	404,997	121399,000	11,000	1632,000	22,256	13,011	2782,000	0,000	65,000		45,453		
19	0,50	0,317	1052,382	388,200	115762,000	148,000	1632,000	23,248	12,848	2441,000	0,000	64,000		45,268		
20	0,50	0,309	1073,670	299,953	110588,000	397,000	1574,000	19,676	11,780	2125,000	0,000	59,000		54,567		
20	0,50	0,315	787,889	358,255	85092,000	31,000	1305,000	19,236	11,495	2116,000	0,000	47,000		40,959		
4	4,75	0,306	595,453	226,976	63118,000	89,000	1036,000	19,375	10,906	2015,000	1,000	54,000		30,733		
4	4,75	0,306	874,217	266,266	92667,000	331,000	1429,000	19,519	11,291	2069,000	0,000	54,000		44,788		
10	4,75	0,338	1036,095	582,026	120187,000	5,000	2121,000	27,513	15,399	3219,000	0,000	74,000		37,658		
10	4,75	0,448	1194,329	647,166	177955,000	97,000	2413,000	26,172	15,017	3795,000	0,000	80,000		45,634		
13	4,75	0,293	391,570	187,483	39157,000	14,000	792,000	18,657	10,214	1903,000	0,000	51,000		20,988		
13	4,75	0,276	400,896	185,023	38486,000	14,000	792,000	17,588	8,949	1706,000	0,000	40,000		22,794		
22	4,75	0,260	435,707	201,708	40085,000	22,000	865,000	26,461	14,984	2355,000	0,000	70,000		16,466		
22	4,75	0,350	623,966	298,381	73628,000	48,000	1128,000	28,556	14,531	3341,000	1,000	70,000		21,851		
23	4,75	0,239	1011,583	284,680	84973,000	198,000	1470,000	16,267	9,837	1399,000	0,000	53,000		62,186		
23	4,75	0,313	900,361	349,122	97239,000	54,000	1470,000	16,933	12,723	1778,000	0,000	45,000		53,172		
2	10,00	0,305	164,657	105,672	16795,000	3,000	570,000	18,283	10,939	1938,000	0,000	50,000		9,006		
2	10,00	0,458	180,457	114,625	27249,000	3,000	570,000	18,727	10,628	2884,000	0,000	48,000		9,636		
11	10,00	0,240	718,337	331,392	61777,000	119,000	1362,000	28,707	15,634	2354,000	1,000	82,000		25,023		
11	10,00	0,267	688,945	339,730	62694,000	119,000	1362,000	22,538	14,870	2096,000	0,000	65,000		30,568		
15	10,00	0,239	591,976	305,136	50318,000	66,000	1110,000	21,624	12,929	1838,000	3,000	58,000		27,376		
15	10,00	0,260	744,844	296,462	67036,000	161,000	1437,000	21,067	14,531	1896,000	0,000	63,000		35,356		
21	10,00	0,219	501,051	214,585	39082,000	24,000	860,000	30,078	18,829	2316,000	0,000	89,000		16,658		
21	10,00	0,261	837,169	211,908	74508,000	311,000	1214,000	33,140	19,064	3083,000	0,000	96,000		25,262		
24	10,00	0,316	815,248	639,359	85601,000	12,000	2090,000	26,486	14,698	2834,000	0,000	73,000		30,780		
24	10,00	0,305	845,020	649,363	85347,000	12,000	2090,000	28,066	15,262	2975,000	0,000	65,000		30,108		
		<b>Mittelwert</b>	<b>0,305</b>													
		<b>Stand.Abw</b>	<b>0,084</b>													

## 9.2.3.5 Messwerte subjektiv, T2\* FFE (2 mm)

Knie Nr.	T2 FFE lang Area	Aussehbereich					Sum	Min	Max	1. Normierung	2. Delta zu Aussehb			
		Mean	Sdev	Length	Mean	Sdev								
1	0,066	1070,343	254,67	37462	562	1471	1,383	15,25	4,01	549	8	32	70,18642623	1055,093
3	0,188	2717,048	353,231	228232	1464	3290	1,836	22,529	13,44	1915	0	61	120,602246	2694,519
12	0,068	808,571	279,131	28300	211	1291	0,955	11,375	4,57	364	0	23	71,08316484	797,196
14	0,111	1241,064	241,1	58330	471	1549	1,507	15,321	7,364	812	0	31	81,004112	1225,743
18	0,081	1871,981	445,854	78619	889	2654	1,196	25,756	3,031	1056	18	33	72,67747321	1846,125
9	0,089	866,75	393,713	41604	393	1973	1,245	13,956	4,857	628	0	35	62,10590427	852,794
16	0,043	718,419	304,036	22271	335	1315	1,067	12,538	7,027	326	3	36	57,29933004	705,881
17	0,048	486,207	246,332	14100	57	926	1,246	10,464	6,529	293	0	26	46,46473624	475,743
19	0,088	2212,823	477,691	104003	1068,13	2810,343	1,306	21,145	12,146	1036	0	54,007	104,6499409	2191,678
20	0,071	650,282	282,8	25361	106	1239	1,283	11,414	4,5	331	3	22	56,9723147	638,868
4	0,075	864,97	193,507	28544	447	1275	1,262	14,667	1,568	528	13	20	58,97388696	850,303
10	0,104	573,125	330,81	27510	65	1338	1,25	11,761	1,58	541	9	15	48,73097526	561,364
13	0,096	807,952	189,146	33934	387	1176	1,287	13,267	2,499	597	9	21	60,89937439	794,685
22	0,079	779,5	321,052	31180	246	1425	1,278	17,545	6,916	772	0	45	44,42861214	761,955
23	0,116	769,443	543,815	46936	42	1822	1,479	17,429	1,5	976	14	23	44,14728326	752,014
2	0,047	347,467	129,729	10424	164	694	0,894	12,45	4,872	249	1	24	27,90899598	335,017
11	0,063	820,724	435,106	23801	101	1896	1,036	16,097	8,138	499	0	39	50,98614649	804,627
15	0,046	634,042	303,163	15217	111	1067	0,884	11,778	7,963	318	0	25	53,832739	622,264
21	0,19	539,878	291,784	48589	67	1262	1,764	18,744	10,494	1687	0	61	28,8027102	521,134
24	0,045	861,538	224,00	22400	179	1531	0,877	22,77	11,931	1389	3	52	37,83655931	838,768

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön allen, die mich während der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer und Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin von Pückler geb. Amort für die herausragende Betreuung und Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche und maßgebliche Unterstützung bei der Ausfertigung meiner Arbeit.

Ich möchte der Firma Amedrix und der Firma Guerbet für die Bereitstellung der von mir verwendeten Materialien danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Failing für die statistische Beratung zum Studiendesign und Herrn Dr. Bokemeyer für die anfängliche Betreuung dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen der Universität Gießen für ihre Mitwirkung und ihr Verständnis in den Versuchsphasen.

Ich bedanke mich im Speziellen für die Unterstützung der Mitarbeiter der Abteilung für Bildgebende Verfahren, Kleintierklinik der Justus-Liebig-Universität, sowie den Mitarbeitern des Labors, Institutes für Veterinär - Anatomie, - Histologie, und Embryologie, ohne deren fachkundige Mitarbeit diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Speziell den Kollegen aus dem Zelllabor möchte ich einen außerordentlichen Dank für ihre Mithilfe aussprechen.

Ein weiterer Dank geht an die Abteilung der Orthopädie aber auch alle anderen klinischen Mitarbeiter der Kleintierklinik, die durch ihr Einspringen und ihr Verständnis viele der zeitaufwendigen Laborversuche erst realisierbar gemacht haben.

Mein abschließender und ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Verlobten Malte Pollmann und meinen Freunden, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht entstanden wäre.

DANKE

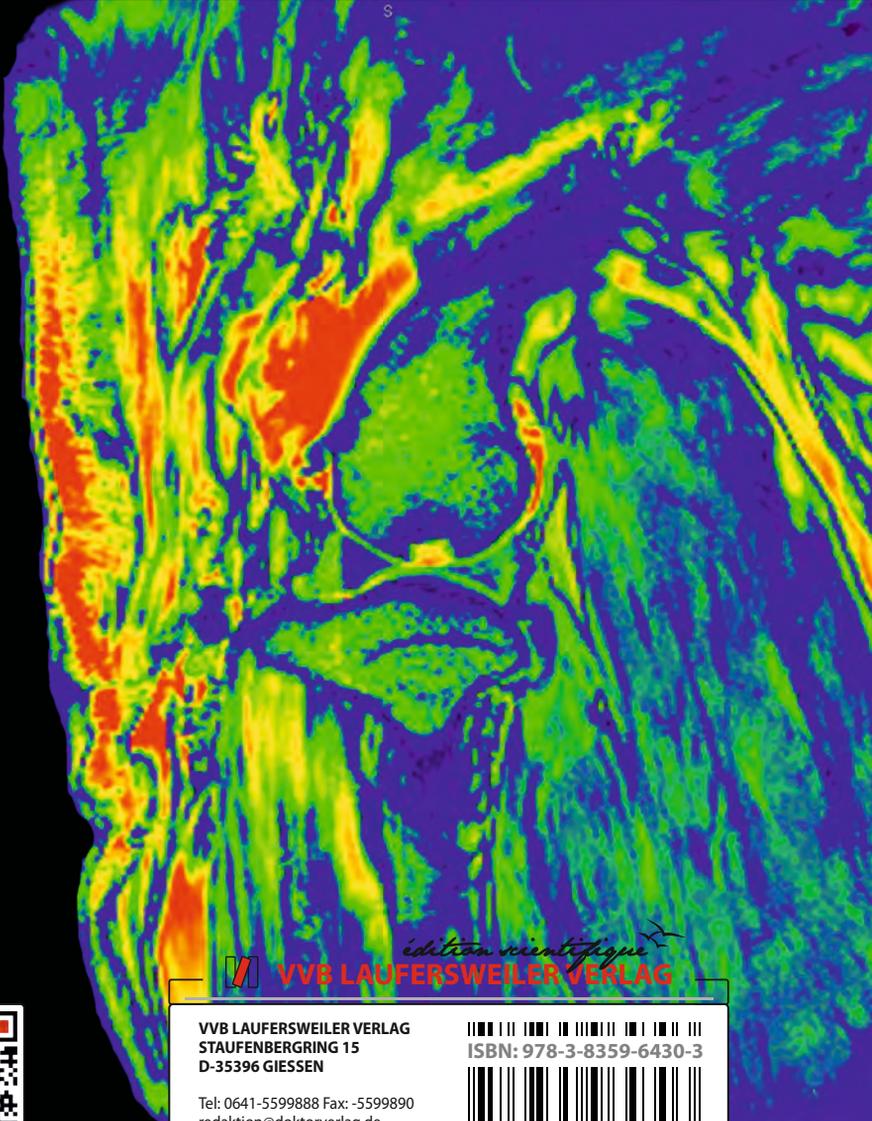
## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Karen John







5



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6430-3



9 783835 964303