Simon Thönnies

Dr. med.

Optimierung eines Sehnen- und Bandxenografts basierend auf einem aviären Sehnenscaffold

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Arash Moghaddam-Alvandi

Muskuloskelettale Erkrankungen stellen heutzutage einen der häufigsten Gründe für Arztkonsultationen und Krankenhausbehandlungen in Deutschland dar. Durch die Zunahme an akuten Verletzungen und chronisch-degenerativen Rupturen in der immer älter werdenden und gleichzeitig immer mehr sporttreibenden Gesellschaft stehen nicht nur die Gesundheitssysteme, sondern auch die Behandler dieser Verletzungen unter Druck. Die aktuellen Behandlungsoptionen für eine Sehnen- oder Bandverletzung sind mannigfaltig, aber immer noch limitiert in ihrer Anwendung. Für den kompletten Bandersatz stehen dem Chirurgen heute in erster Linie Autografts (aus dem Patienten-eigenen Körper) oder Allografts (von Leichenspenden) zur Verfügung. Vor allem die immer noch häufigen Rekonstruktionsversagen durch Re-Ruptur und weitergehende Nachteile wie die donor-seitige Morbidität ließen den Wunsch nach einem alternativem Graft aus dem Labor reifen. Daher bieten Xenografts, also Konstrukte mit ihrem Ursprung aus tierischem Gewebe, aufgrund ihrer biomechanischen Eigenschaften bei ubiquitärer Verfügbarkeit eine aussichtsreiche Option für Band- und Sehnenrekonstruktionen. Diese Arbeit untersucht deshalb, welche Revitalisierungsmethode aviärer, dezellularisierter Xenografts möglich sowie effizient ist, ob die Konstrukte trotz aggressiver Dezellularisierung eine 3-D-Zellkultur erlauben und ob Zell-Graft-Interaktionen als Langzeiterfolg mittels confocaler Lasermikroskopie nachweisbar sind.

Aviäre FDP-Sehnen wurden dazu dezellularisiert und auf die entstandenen Scaffolds eine Suspension von 2×10^6 GFP-exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten durch unterschiedliche Besiedlungsmethoden aufgebracht. Genutzt wurde *Statisches Pipettieren* einer Zellsuspension auf den Scaffold, die *Zentrifugation* von Scaffoldproben im Tube eingetaucht in Zellsuspension (10 Minuten en bloc vs. 5 x 2 Minuten mit Resuspension der Zellen) sowie ein eigens konstruierter Bioreactor, der die Besiedelung *vakuum-assistiert* ermöglichte. Die Analysen von DNA-Gehalt sowie Zelllebensfähigkeit (MTS-Assay) erfolgten nach 24 Stunden bzw. 10 Tagen 3-D-Kultur. Zusätzlich wurden histologische Schnitte mit H&E- oder Immunfluoreszenzfärbung angefertigt, der die confocale Lasermikroskopie zur Detektion von Zell-Zell- und Zell-Scaffold-Interaktionen folgte. Als Kontrolle dienten native FDP-Sehnen sowie unbesiedelte Xenografts. Für statistische Analysen wurden One-Way-ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Tests und Studentische t-Tests mit $p < 0,05$ benutzt.

Verglichen mit unbesiedelten Konstrukten zeigten alle besiedelten Xenografts eine deutliche DNA-Zunahme durch lebendige Zellen nach 24 Stunden Kultur. Ein signifikanter Unterschied und damit ein Vorteil für den Einsatz von *Zentrifugation* gegenüber *Pipettieren* ergab sich nicht. Lediglich das Resuspendieren des Zellpellets alle zwei Minuten während der *Zentrifugation* erzielte im Vergleich mit *10 Minuten Zentrifugation* en bloc einen signifikant niedrigeren DNA-Gehalt sowie eine signifikant niedrigere MTS-Konversion durch lebendige Zellen nach 24 Stunden Kultur.

Die initiale Besiedlungseffizienz nach 24 Stunden ergab beim Vergleich der durch die DNA nachgewiesenen Zellen mit den initial für die Besiedlung eingesetzten 2×10^6 NIH 3T3 Fibroblasten Werte zwischen 6,58 % und 13,31 %. Zehn Tage 3-D-Zellkultur führten zu einem signifikanten Anstieg des DNA-Gehalts in allen Gruppen (2,66-facher bis zu 4,87-facher Anstieg) außer der vakuum-assistierten Besiedlung. Die aus den DNA-Werten nach 10 Tagen gemessen am Zellgehalt einer nativen Sehne ($1,83 \pm 0.14 \times 10^4$ Zellen / mg Nativsehne) ermittelte Abschlussevaluation der Effizienz lag bei 14,72% durch Pipettieren, 9,42% durch 5 x 2 Minuten Zentrifugation bzw. 13,52% durch 1 x 10 Minuten Zentrifugation. Histologisch zeigte sich die Ausbildung eines Mono- bzw. Bilayers der eingesetzten Zellen (DAPI und GFP positiv) auf der Graftoberfläche, assoziiert mit spärlicher Evidenz von Zellinfiltration des Graftmaterials. Die Immunfluoreszenz (positiv auf Actin und Vinculin) wies in der confocalen Lasermikroskopie auf die Ausbildung von Fokaladhäsionen zwischen den Zellen an sich sowie zwischen den Zellen und dem Graftmaterial hin.

Schlussfolgernd ist die Revitalisierung aviärer Xenografts mit Standardverfahren des Tissue Engineerings erfolgreich möglich. Die Konstrukte erlauben dabei trotz der initialen, chemischen Dezellularisierung eine anschließende 3-D-Zellkultur mit starker Zellproliferation. Nur die vakuum-assistierte Besiedlung scheint nach guter Beladung der Scaffolds mit lebendigen Zellen diesen dauerhaft zu schaden und eine erfolgreiche Proliferation zu verhindern, sodass eine Optimierung der Kulturbedingungen erforderlich bleibt. Die Zentrifugation kann als arbeitserleichternde Besiedlungsmethode eingesetzt werden, wobei jedoch auf eine Resuspendierung des Zellpellets alle zwei Minuten verzichtet werden sollte. Von großem Potenzial ist der Einsatz confocaler Lasermikroskopie, denn sie ermöglicht Einblicke in die Ultrastruktur von Graftmaterial sowie in die Interaktionen von Zelle und Graft. In dieser Arbeit wurde vor allem das Potenzial aufgezeigt, die dauerhaften Zell-Zell- und Zell-Scaffold-Verbindungen in Form von Fokaladhäsionen nachzuweisen. Diese sind von Nöten, um eine zukünftige, weitere Optimierung der Xenografts durch mechanische Behandlung in einem Bioreactor zu realisieren. In der konsequenten Verbesserung des Tissue Engineerings ist dabei das Verständnis, wie Zellen sich in ihrer Mikroumgebung verhalten, ein entscheidender Schritt zum einsatzfähigen Graft aus dem Labor. Xenografts stellen also nicht nur in der Zukunft eine Option im Sehnersatz dar, sondern helfen als Modell auch dabei, neue Erkenntnisse über die grundlegenden Herausforderungen des Tissue Engineerings von Sehnen- und Bandmaterial zu erlangen.