

Aus der Orthopädischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

---

**Differenzierungsmuster von Chondrozyten und Knochenmarkstammzellen  
in der Langzeitperfusionskultur  
unter mechanischer Belastung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Pavlina Raisl

Krnov (CZE)

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Jochum Priv.-Doz. Dr. med. A. Frick Prof. Dr. med. A. Gratzl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. med. H. R. Dürr
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Oktober 2004

## **Danksagungen**

Herrn PD Dr. med. Hans Roland Dürr gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die wertvollen Anregungen, seine engagierte Anleitung, seine jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und für die Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Stefan Milz für die sehr lehrreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die exzellente Mitarbeit bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Frau Ulrike Mohr danke ich für die wertvollen Diskussionsbeiträge, die gute Zusammenarbeit und Ihre Hilfe als Lektorin meiner Arbeit.

Frau Nandl Schultheiß-Buchheim hat mir sowohl mein Studium, als auch diese Doktorarbeit durch ihre fürsorgliche Unterstützung ermöglicht, und war immer für mich da. Ihr gilt mein besonderer Dank, den ich dadurch zum Ausdruck bringen möchte, dass ich ihr diese Arbeit widme.

**Diese Arbeit ist  
Nandl Schultheiß-Buchheim gewidmet.**

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1.     <u>Einleitung</u></b> .....	1
<b>1.1.   Ziel</b> .....	1
<b>1.2.   Morphologie des Gelenkknorpels</b> .....	3
<b>1.3.   Derzeitige Therapieverfahren von Gelenkknorpeldefekten</b> .....	4
1.3.1. Anbohrung und Mikrofrakturierung .....	4
1.3.2. Periostlappenplastik .....	4
1.3.3. Osteochondrale autologe Transplantation (OAT) .....	4
1.3.4. In vitro Zellamplifikation und Transplantation in Suspension .....	5
<b>1.4.   Experimente mit 3-D Zellkulturen</b> .....	5
1.4.1. Ausgangszellen .....	5
1.4.2. Trägersysteme .....	6
1.4.3. Kulturkammern .....	7
<b>1.5.   Bisherige Resultate der in vitro Experimente</b> .....	9
<b>1.6.   In vivo 3-D Zellkulturen im Tierversuch</b> .....	10
<b>1.7.   Problematik der aktuellen Situation und Fragestellung</b> .....	10
<b>2.     <u>Material und Methodik</u></b> .....	12
<b>2.1.   Konstruktion und Bau der Versuchskammer</b> .....	12
<b>2.2.   Gewebekultur</b> .....	15
2.2.1. Gewinnung von Chondrozyten aus Schweineknorpel .....	15
2.2.2. Aufarbeitung des Gelenkknorpels .....	15
2.2.2.1. Chondrozytenisolierung .....	15
2.2.2.2. Vitalitätsbestimmung und Zellzahlermittlung .....	16
2.2.3. Amplifikation in Monolayerkultur .....	17

2.2.4.	Separation der Zellen aus der Monolayerkultur .....	18
2.2.5.	Gewinnung und Präparation von Knochenmarkstammzellen .....	18
2.2.6.	Implantation der Zellen auf das Trägermaterial .....	19
2.2.6.1.	Präparation von Spongiosazylinder und Zellimplantation .....	19
2.2.6.2.	Präparation von Vliesmaterial und Zellimplantation .....	21
<b>2.3.</b>	<b>Versuchsaufbau</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4.</b>	<b>Histologische Präparation</b> .....	<b>23</b>
2.4.1.	Fixierung .....	23
2.4.2.	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	23
2.4.3.	Hämatoxylin und Hämatoxylin/Eosin Färbungen .....	24
2.4.4.	Immunhistochemische Untersuchung .....	24
2.4.4.1.	Antikörper .....	24
2.4.4.2.	Technik der Immunfixation und Färbung .....	25
<b>2.5.</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie</b> .....	<b>26</b>
2.5.1.	Fixation .....	26
2.5.2.	Präparation .....	27
2.5.3.	Untersuchungstechnik .....	27
<b>3.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Ergebnisse der Zellkultur</b> .....	<b>28</b>
3.1.1.	Knorpelzellen vom Schwein .....	28
3.1.2.	Humane Knochenmarkstammzellen .....	28
<b>3.2.</b>	<b>Ergebnisse der Experimente mit Tutogen<sup>®</sup> Spongiosa als Träger</b> ....	<b>29</b>
<b>3.3.</b>	<b>Ergebnisse der Experimente mit Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies als Träger</b> .....	<b>30</b>
3.3.1.	Primäre Implantation der Chondrozyten .....	31
3.3.2.	Implantation der Chondrozyten nach Monolayerkultur .....	45

3.4.	<b>Ergebnisse mit humanen Knochenmarkstammzellen</b> .....	47
4.	<b><u>Diskussion</u></b> .....	54
4.1.	<b>Zellzahl und Vitalität der Ausgangszellen</b> .....	54
4.2.	<b>Trägersysteme</b> .....	54
4.3.	<b>Zelldifferenzierung und mechanischer Stimulus</b> .....	56
4.4.	<b>Humane Knochenmarkstammzellen in der belasteten Kultur</b> .....	57
4.5.	<b>Problematik der Langzeitkultur</b> .....	58
4.6.	<b>Schlußfolgerung</b> .....	59
5.	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	62
6.	<b><u>Literatur</u></b> .....	66
7.	<b><u>Anhang</u></b> .....	71

## **1. Einleitung**

Die Funktionsfähigkeit eines Gelenkes ist in hohem Maße abhängig vom Zustand des Gelenkknorpels. Unverändert gilt die Feststellung, die Hunter schon 1743 getroffen hatte: „From Hippocrates to the present age it is universally allowed that ulcerated cartilage is a troublesome thing and that, once destroyed, is not repaired“ (Hunter 1743).

### **1.1. Ziel**

Die Verwendung von Gewebetransplantaten in der Orthopädie ist ein seit langem etabliertes Verfahren. Autologe und allogene Knochentransplantate sind in der ossären Defektrekonstruktion weit verbreitet, Sehmentransplantate insbesondere des Kreuzbandapparates am Kniegelenk unbestritten erfolgreich. Auch zellfreie oder anorganische Träger, welche lediglich eine beschränkte mechanische Stabilität bis zum Einwachsen normalen Gewebes bieten, sind bei Knochendefekten von großer Bedeutung. Aus dieser Situation heraus resultierte letztlich auch der Gedanke Knorpeldefekte des Gelenkes bei jüngeren Patienten durch Gewebetransplantate zu rekonstruieren.

Eine natürliche Regeneration von Knorpel ist nur sehr eingeschränkt möglich. Der dabei typischerweise gebildete Ersatzknorpel (Faserknorpel) ist hinsichtlich seiner histologisch strukturellen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften natürlichem Gelenkknorpel (hyalinem Knorpel) unterlegen. Insbesondere Knorpeldefekte des jüngeren Patienten sind dabei aufgrund der eher mäßigen konventionellen Therapieergebnisse problematisch. Der Versuch der autologen Chondrozytentransplantation wurde deshalb bereits 1989 eingeführt und zeigt bei geeigneter Indikationsstellung klinisch gute Ergebnisse (Brittberg, Lindahl, et al. 1994).

Aktuell sind eine Reihe von Techniken in der Entwicklung:

- die alleinige Transplantation von Knorpelzellen mit oder ohne Träger
- die Transplantation von Vorläuferzellen aus Periost, Perichondrium oder Knochenmarkstammzellen mit oder ohne Träger



- die Implantation von zellfreien Transplantaten als Platzhalter bis zum Einwachsen des Gewebes
- die Transplantation genetisch modifizierter Zellen mit Exprimierung spezifischer Produkte zur Beschleunigung der Defektreparatur (Grande, Breitbart, et al. 1999)

Im Gegensatz zur klinisch bereits etablierten Transplantation autologer, in vitro vermehrter Chondrozyten, steht die Entwicklung von strukturierten dreidimensionalen (3-D) Transplantaten. Die primäre 3-D Kultur verhindert weitestgehend eine Dedifferenzierung der Zellen in der Präimplantationsphase und die Formgebung der Transplantate kann den Erfordernissen angepasst werden (Rudert, Moller, et al. 2000).

Entscheidend für das physiologische Verhalten und die langfristige Stabilität des transplantierten Neoknorpels ist aber nicht nur die histologische und biochemische Zusammensetzung, sondern insbesondere auch der typische strukturelle Aufbau.

Ziel dieser Untersuchung war es deshalb, den Einfluss mechanischer Faktoren, wie den alternierenden mechanischen Druck auf Chondrozyten in der Phase des Wachstums und der Organisation zu einem transplantierbaren Implantat in einer Langzeitperfusionskultur zu evaluieren. Zum Ausschluss anderer Einflüsse sollte dies ohne den Einsatz bekannter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren erfolgen.

Zusätzlich erschien es interessant als Ausgangsmaterial nicht nur Chondrozyten, sondern auch humane Knochenmarkstammzellen zu verwenden. Diese sind in der Lage sich in eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen zu differenzieren (Thomson, Itskovitz-Eldor, et al. 1998). Die Fragestellung war nun, ob die chondrogene Differenzierung der Stammzelle ohne weitere Faktoren lediglich durch mechanische Einflüsse möglich ist.

Primäres Ziel dieser Arbeit war die gezielte mechanische Stimulation von Chondrozyten und Knochenmarkstammzellen mit typischen im humanen Gelenk vorliegenden Kräften in der Langzeitperfusionskammer.

## 1.2. Morphologie des Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel erscheint im nativen, unfixierten Zustand weiß-bläulich, die Schnittfläche ist glasig-opak. Ausdifferenzierter Knorpel ist gefäß- und nervenfrei. Die Chondrozyten nehmen nur ca. 1-5 % des gesamten Gewebavolumens ein. Das übrige Knorpelgewebe besteht aus extrazellulärer Matrix.

Die extrazelluläre Matrix ist in erster Linie verantwortlich für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels. Sie besteht zu etwa 70% aus Wasser und Elektrolyten, sowie aus Kollagenfibrillen, Proteoglykanen, Lipiden und Glykoproteinen.

Die Proteoglykane (PG) bestehen aus einer zentralen Hyaluronsäurekette, an die eine Vielzahl von negativ geladenen Polysaccharidketten aus der Gruppe der Glykosaminoglykane (GAG), v.a. Chondroitinsulphate und Keratansulphate, gebunden sind. Die PG binden Kationen (v.a. Natrium) und erzeugen damit einen Quellungsdruck von ca. 0,3 MPa, der das Kollagenfasernetz unter Spannung setzt (Maroudas 1976).

Im Knorpelaufbau lassen sich 4 Zonen unterscheiden:

1. die superfizielle Tangentialzone mit höchstem Kollagen- und erhöhtem Wassergehalt sowie spindelförmigen Chondrozyten,
2. die Transitionalzone mit aktiven Chondrozyten und dem höchsten Gehalt an Proteoglykanen,
3. die Radiärzone mit einer säulenartigen Anordnung der sehr aktiven Chondrozyten und hohem Gehalt an PG bei vergleichsweise niedrigem Wassergehalt,
4. der Kalzifizierungszone als Zwischenschicht zur subchondralen Grenzlamelle mit niedrigem PG Gehalt und mineralisiertem Knorpel.

Aufgabe des Gelenkknorpels ist die dynamische Adaption der Kontaktfläche an die anatomischen Gegebenheiten durch elastische Verformung. Die dabei auftretenden Kräfte können durchaus das 6-8fache des Körpergewichtes auf die resultierende Kontaktfläche erreichen.

Untersuchungen zur Biomechanik des Gelenkknorpels haben gezeigt, dass die Kollagenfasern hauptsächlich für die elastischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich sind und die Proteoglykane für die viskoelastischen Eigenschaften (Bader, Kempson 1994). Wird der Knorpel auf Druck belastet, dann wird die gespeicherte, interstitielle Flüssigkeit vergleichbar mit einem Schwamm durch die

Poren der Proteoglykane gepresst, wobei erheblicher Strömungswiderstand geleistet wird. Erst wenn die gesamte Flüssigkeit herausgepresst ist, werden die Proteoglykane auf Druck belastet (Mow, et al. 1984).

### **1.3. Derzeitige Therapieverfahren von Gelenkknorpeldefekten**

#### **1.3.1. Anbohrung und Mikrofrakturierung**

Die Läsion wird bis über die subchondrale Grenzlamelle hinaus vertieft oder diese durch vielfache Bohrungen perforiert. Dadurch kommt es zum Einstrom von mesenchymalen Stammzellen. Diese können in Faserknorpel differenzieren. Die erzielte Defektheilung ist mechanisch eher minderwertig. Unter Umständen müssen zusätzliche Maßnahmen wie Umstellungsosteotomien zur Entlastung des betroffenen Gelenkabschnittes durchgeführt werden.

#### **1.3.2. Periostlappenplastik**

Periost besitzt ähnlich wie Perichondriumgewebe eine chondrogene Potenz, d.h., insbesondere die Kambriumschicht des Periostes ist zu einer Redifferenzierung in Knorpelgewebe fähig (Ham 1930). Das gewonnene, autologe Periosttransplantat wird mittels Fibrinkleber oder Naht in der Läsion fixiert. Die zu erwartenden Ergebnisse stehen in enger Korrelation zur Defektgröße und Lokalisation. Größere Defekte oder Defekte im patellaren Gleitlager oder der tibialen Fläche des Kniegelenkes erwiesen sich als besonders ungünstig. Erzielt wird in vielen Fällen nur eine partielle Heilung oder Restitution mit minderwertigem Knorpelgewebe (Nehrer 1999).

#### **1.3.3. Osteochondrale autologe Transplantation (OAT)**

Die osteochondrale autologe Transplantation (OAT) ist besonders für chondrale und osteochondrale Defekte und Osteonekrosen in der Belastungszone des Gelenkes geeignet. Dabei werden autogene Knorpel-Knochenstücke aus gesunden Zonen des Kniegelenkes in den Defekt transplantiert. Die Entnahmestelle kann zwar aus weniger funktionell belasteten Zonen gewählt werden, trotzdem ist das Verfahren naturgemäß limitiert. Interessant sind Beobachtungen bei Patienten, bei denen die

Implantation nicht in einer niveaugleichen Defektdeckung resultierte. Hier kommt es zur Degeneration des Implantates als Hinweis, dass eine suffiziente mechanische Belastung im physiologischen Bereich zur Knorpelregeneration notwendig ist (Schottle 2001).

#### 1.3.4. In vitro Zellamplifikation und Transplantation in Suspension

Nach initialen Tierversuchen findet seit Ende der 80er, Anfang der 90er Jahre erstmals eine Methode der Chondrozytentransplantation Anwendung. Es werden in einer ersten Operation Chondrozyten aus dem Kniegelenk des Patienten entnommen. Diese werden dann in einer Monolayerkultur amplifiziert und nach ca. 14 Tagen als Suspension eingebracht. Die Chondrozyten-Suspension muß noch entsprechend zubereitet werden und der Defekt mit einem Periostlappen bedeckt werden (Brittberg 1994). Die vergleichsweise guten frühen Ergebnisse dieses Verfahrens ließen sich auch in der Langzeitbeobachtung validieren, sodass dieser erste therapeutische Ansatz bei umschriebenen Knorpeldefekten, die eine entsprechende Defektzubereitung und insbesondere Defektdeckung zulassen, zur etablierten Therapieoption geworden ist (Peterson 2000). Nachteil des Verfahrens bleibt aber stets die schlechte initiale Stabilität, sowie die Unmöglichkeit, große oder komplexe Defekte zu beheben.

### 1.4. Experimente mit 3-D Zellkulturen

#### 1.4.1. Ausgangszellen

Prinzipiell erscheint es günstig, zur Generierung eines Knorpeltransplantates auch Chondrozyten als Ausgangszellen einzusetzen. Das gewonnene Transplantat sollte damit hinsichtlich der gebildeten Matrix wie Kollagen II und PG dem gewünschten Zielgewebe möglichst ähnlich sein. Zudem sind Chondrozyten relativ einfach zu gewinnen und in homogener Verteilung zu isolieren (Grande 1999). Ein Nachteil ist allerdings die nur begrenzte und vergleichsweise geringe Menge an Ausgangszellen, die im menschlichen Körper zur Verfügung stehen. Ohne größere Defekte zu verursachen, lassen sich Chondrozyten meist nicht in den Mengen gewinnen, die zur dichten Besiedlung von größeren Transplantaten notwendig wären.

Als Alternative zur Generierung von Knorpeltransplantaten aus Zellen mit chondrogener Potenz bietet sich die Möglichkeit einer Differenzierung anderer Zelltypen an, welche einfacher oder in größerer Anzahl verfügbar sind. Dieser Mechanismus stellt die Situation der Knorpeldefektheilung nach Einstrom von Zellen des Blutes oder Markraumes dar. Stammzellen des Muskels oder des Knochenmarkes, ja sogar der Synovia oder dermale Fibroblasten lassen sich unter bestimmten biochemischen Bedingungen in Chondrozyten differenzieren und in Defekte implantieren (Young 1993; Young 1995; Wakitani 1994; Nishimura 1999; Mizuno 1996). Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle wurde deshalb von Caplan geprägt (Bruder 1994; Caplan 1994). Letztlich erfolgt durch ex- und intrinsische Faktoren die Differenzierung von der mesenchymalen Stammzelle über Chondroprogenitorzellen, Chondroblasten, Chondrozyten 1 und 2 hin zum hypertrophen Chondrozyten (Buckwalter 1996). Problematisch bleibt jedoch auch hier der Erhalt des Phänotyps über längere Zeiträume (Yoo 1998).

#### 1.4.2. Trägersysteme

Die Monolayerzellkultur ist, wie oben angeführt, nicht geeignet, im Verbund transplantierbares Knorpelgewebe zu generieren. In der Monolayerkultur kommt es zum kontinuierlichen Abstrom von Matrixproteinen, insbesondere den Proteoglykanen durch Diffusion ins Medium. Den Zellen muß aber ein Rahmen gegeben werden, der es ihnen erlaubt, die produzierte Matrix in unmittelbarer Umgebung zu deponieren. Der dreidimensionalen, mechanischen Stabilisierung der Zellen kommt deshalb eine entscheidende Bedeutung zu. Im Prinzip lassen sich dabei zwei alternative Wege unterscheiden. Zum einen ist dies die Pelletkultur, in der sich relativ dicht implantierte Zellen durch ein geeignetes Bindematerial, wie z.B. Alginat oder Fibrin, im Verbund halten lassen, bis die eigene Matrix die Übernahme der Stützfunktion erlaubt. Die Primärstabilität dieser Konstrukte ist jedoch sehr gering und kann erst nach ausreichender eigener Matrixproduktion einen klinisch relevanten Bereich für ein transplantierbares Implantat erreichen. Aus diesem Grund setzt man bereits frühzeitig zum anderen Trägerstrukturen ein, die bis zum Zeitpunkt der matrixbedingten mechanischen Stabilität eine ausreichende Stützfunktion bieten. Idealerweise sollten dies im Körper resorbierbare Substanzen sein, die nach Zunahme der Eigenfestigkeit des Implantates abgebaut werden und die die weitere

Strukturierung der kollagenen Matrix auf diese Weise nicht beeinflussen oder behindern können. Biochemisch dürfen die dabei entstehenden Abbauprodukte den chondrogenen Wachstums- und Differenzierungsprozess nicht hemmen, die Zellanheftung sollte leicht möglich sein. Die grundsätzliche Freiheit des Knorpels von Blutgefäßen erweist sich dabei als vorteilhaft. Zunehmende Bedeutung kommt dabei auch der Anforderung an das Material zur 3-D-Verarbeitung, wie z.B. den 3-D-Printing zu (Sachs 1992).

Zum Einsatz kommen derzeit folgende Materialien:

- Agarose
- Alginat
- Fibrin
- Gelatine
- Hyaluronsäurederivate
- Chitosan
- Kollagen
- Keramik
- Poly (D,L)-Laktid- (PLA, PLLA) und Polyglykosid- (PGA) oder Mischpolymere (PLGA)
- Poly-4-hydroxybutyrat (P-4-HB)

#### 1.4.3. Kulturkammern

##### Monolayerkultur

Die einfachste der möglichen Kulturformen ist die Aussaat der Zellen in eine handelsübliche Flachbodenschale oder Petrischale. Die Zellen haften schnell am Boden der Schale an, fließen während des weiteren Wachstums zusammen, lassen sich aber wieder separieren. Die Beobachtung des Einflusses verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf die Einzelzellen ist relativ einfach möglich. Nachteilig sind der manuelle Mediumwechsel und insbesondere die rasche Dedifferenzierung der Chondrozyten mit Ausbildung von Fibrozyten (Holtzer 1966).

Diese Form der Kultur findet nur noch in der reinen Amplifikation von Zellen vor der Implantation in einem Träger Anwendung, sowie auch in der klinischen Applikation vor Implantation als Gel unter einen Periostlappen.

### Perfusionskultur

Zur Vermeidung des primär nicht erwünschten Effektes von mechanischer Scherung und zur Prozessautomatisierung wurden Perfusionskulturen mit kontinuierlichem oder semikontinuierlichem Mediumzu- und -abstrom entwickelt. Gegenüber den rein statischen Systemen ließen sich dabei deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Beibehaltung des Phänotyps, sowie der typischen Matrixproduktion nachweisen (Sittinger 1994; Bujia 1995a; Pazzano 2000). Das dreidimensional mit Zellen besetzte Präparat lässt sich dabei im Mediumstrom einhängen.

### Bioreaktoren mit mechanischen Einflüssen

Nachdem sich mechanische Faktoren als wichtig für die Differenzierung der Chondrozyten zeigten, lag es nahe, Kultursysteme zu konstruieren, die eine direkte oder indirekte mechanische Stimulierung erlauben. Als einfache Form der Realisierung in 3-D-Kultur wurden rotierende Reaktoren entwickelt, die über zentripetale Kräfte auf das Implantat oder die Zelle in Suspension wirken (Freed 1997). Es zeigte sich eine sehr gute Differenzierung und Matrixproduktion bis hin zu natürlichem hyalinen Knorpel ähnlicher biochemischer Struktur (Freed 1998). Eine Ausrichtung der kollagenen Faserstruktur in nahezu physiologischer Weise war jedoch auch damit nicht zu erzielen, da die Kräfte systembedingt multidirektional auf das Konstrukt einwirkten.

Versuche mit gerichteten hydrostatischen Druckfrequenzen auf 3-D-Kulturen erfolgten bereits 1987 (Veldhuijzen 1987). Eine kontinuierliche Applikation in einer Perfusionskultur war jedoch bisher nicht möglich. Zur Umgehung dieses Nachteils wurde 1999 einer der fortschrittlichsten Reaktoren von Carver entwickelt (Carver 1999). Neben einer kontinuierlichen Perfusion lassen sich dabei intermittierende gerichtete hydrostatische Drücke bis zu 500 psi applizieren. Die GAG-Syntheserate war damit in der 3-D Kultur um mindestens das zweifache gegenüber nicht beeinflussten Chondrozytenpräparationen erhöht.

## **1.5. Bisherige Resultate der in vitro Experimente**

Der experimentelle Nachweis einer verstärkten Matrixproduktion durch explantierte Chondrozyten bei ca. 3 MPa gelang 1985 (Lippiello 1985). Dass experimentell eine mechanisch induzierte, chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen stattfinden kann, wurde bereits von Hall 1968 in vitro nachgewiesen (Hall 1968). In diesen ersten Experimenten zeigte sich die Bildung von Faserknorpel an 9-12 Tage alten Hühnerembryonen unter alternierender mechanischer Last zwischen zwei Skelettsegmenten.

Versuche an Chondrozyten in der Monolayerkultur auf flexiblen, dehnbaren Flaschenböden zeigten im Vergleich zur nicht mechanisch belasteten Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der cAMP und GAG-Synthese (De Witt 1984; Uchida 1988). Dynamische Belastungen von 3-D-Chondrozytenkulturen in flexibler Agarose durch Variierung des umgebenden Gasdruckes ließen ebenfalls eine deutlich vermehrte Matrixproduktion erkennen (Buschmann 1995). Seitens der dabei eingesetzten Frequenzen scheint in aktuellen Arbeiten ein Bereich zwischen 0,3 – 1,0 Hz als untere Grenze und 1,0 – 3 Hz als obere Grenze ideale Bedingungen zu bieten (Lee 2000). Unter 1 Hz bei 10 % relativen Einpressdruckes über vier Wochen zeigte sich z.B. ein mehr als sechsfacher Anstieg der Matrixproduktion versus mechanisch nicht belasteter Kontrollen (Mauck 2000). Dagegen konnte 1994 an Knorpelimplantaten im Kurzzeitversuch (23 h) eine Frequenz zwischen 0,002 und 0,01 Hz als ideal, eine Frequenz von 0,1 Hz als weniger optimal beschrieben werden (Kim 1994).

Untersuchungen an kartilaginären Explantaten, die über Tage oder Wochen alternierenden mechanischen Reizen ausgesetzt wurden, bestätigten den positiven Effekt auf Matrixsynthese und Kollagendifferenzierung (Steinmeyer 1997; Frank 2000). Eine ausschließliche statische (auch sehr geringe) Kompression führte jedoch stets zur Abnahme der Matrixproduktion (Chen 1998; Gray 1988; Ragan 2000; Li 2000).

Unter einem dynamischen Druck von ca. 3,4 MPa in einer Frequenz von etwa 0,05 Hz über 2h/Tag und fünf Wochen Kultur wurden Chondrozyten auf PGA Vliesen kultiviert. Hinsichtlich der Matrixproduktion und der mechanischen Festigkeit zeigten sich die Chondrozyten gegenüber den Kontrollimplantaten aus bewegten



Medien, wie auch aus Perfusionenkulturen, überlegen (Carver 1999). Eine physiologische Orientierung der Kollagenfasern war jedoch bisher nicht nachweisbar.

### **1.6. In vivo 3-D Zellkulturen im Tierversuch**

Tierexperimentelle Arbeiten mit langfristig einwirkenden, alternierenden mechanischen Kräften sind aufgrund der Komplexität des Modells eher selten. Als eher zufälliges Ergebnis gelang Soballe et al. ein Nachweis mit Knorpelbildung. In einem Modell, das auf unzureichend kontrollierbaren Scherkräften aufbaute, wurde an Hundefemora nach ca. vier Wochen Faserknorpel generiert (Soballe 1993). In einer Finite-Element-Analyse der Ergebnisse dieses Experimentes wurde die sich dynamisch verändernde Gewebecharakteristik als regulierender Faktor der Differenzierung beschrieben (Prendergast 1997). Aufbauend auf die zitierte Arbeit von Giori (Giori 1995) gelang es Tägil und Aspenberg, in vivo durch Einsatz einer Titankammer, die eine zyklische Kompression des darunterliegenden Knochens mit ca. 2 MPa bei 0,17 Hz erlaubt, in Rattentibiae eine Generierung von Knorpel aus vorab in der Kammer durch Einstrom gebildetem mesenchymalen Gewebe zu erreichen (Tägil 1999).

Interessanterweise gibt es ebenfalls tierexperimentelle Arbeiten mit dynamischer Kompression, bei der es jedoch nicht zur Generierung von Knorpel kam (Guldberg 1997; Lamerigts 2000). Ursächlich dafür könnten die im Vergleich zu der von Tägil verwandten Frequenz von 0,17 Hz deutlich schnelleren Lastwechsel (1 Hz) in beiden Arbeiten sein.

### **1.7. Problematik der aktuellen Situation und Fragestellung**

Aus der vorhandenen Literatur und den beobachteten Befunden kann geschlossen werden, dass es unter mechanischem Einfluss zur Differenzierung zumindest von Faserknorpel aus primären Vorläuferzellen kommen muss.

Auch die Generierung von hyalinem, oder zumindest hyalinähnlichem Knorpel ließ sich in zahlreichen in vitro Experimenten mit verschiedenen Ausgangszellen nachweisen. Die dabei erzielten Konstrukte waren jedoch mechanisch eher minderwertig.

Im Gegensatz zu experimentell nachgewiesenen biochemischen Faktoren sind nach wie vor die spezifischen mechanischen Bedingungen unbekannt, unter denen eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten stattfindet.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, in einer weitgehend automatisierten Versuchskammer definierte mechanische Faktoren auf 3-D-Zellkulturen wirken zu lassen. Es sollte dabei eine Kultivationszeit von mindestens zwölf Wochen angestrebt werden. Gleichzeitig sollten die Dimensionen der Kammer so gewählt werden, dass die für die klinischen Anwendungen notwendige Mindestgröße eines Transplantates von ca. 10 mm generierbar ist.

Zur experimentellen Bestätigung des Versuchsmodells sollten anschließend in einer Testserie folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lassen sich Chondrozyten unter vergleichsweise hohem alternierenden mechanischen Druck langfristig kultivieren ?
2. Welchen Einfluss haben verschiedene Trägersysteme?
3. Wie verändert sich qualitativ die kollagene Matrixproduktion von Chondrozyten in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf und unter verschiedenen mechanischen Bedingungen ?
4. Welchen Einfluss hat dabei die Belastungsfrequenz?
5. Wie verhalten sich Knochenmarkstammzellen unter definierten mechanischen Bedingungen der Kulturkammer?

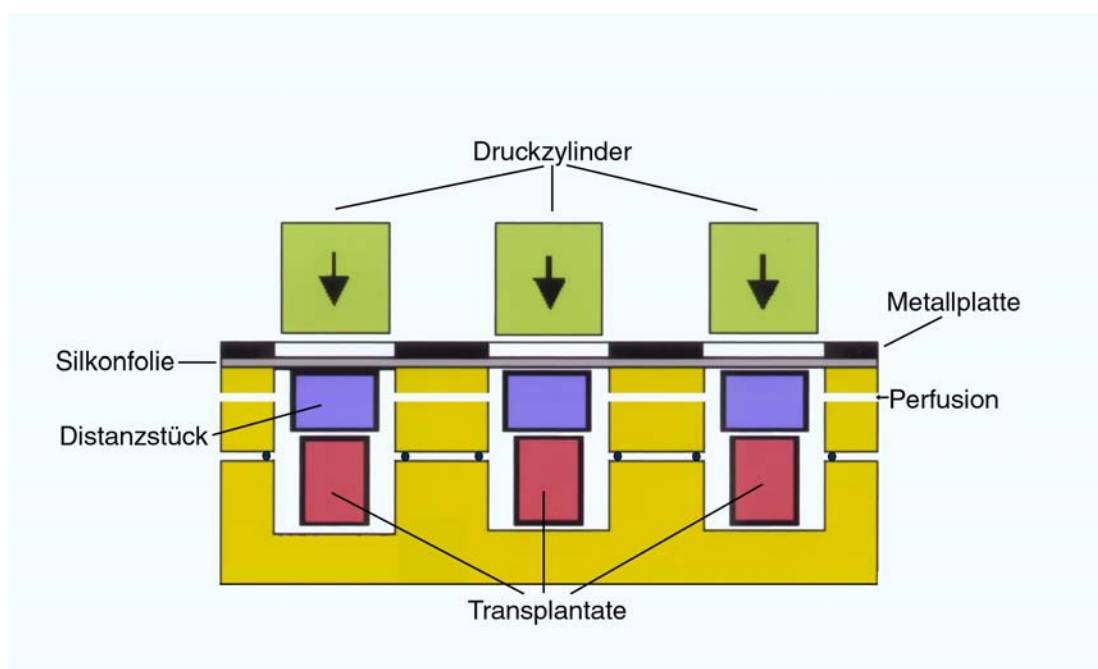
## 2. Material und Methodik

### 2.1. Konstruktion und Bau der Versuchskammer

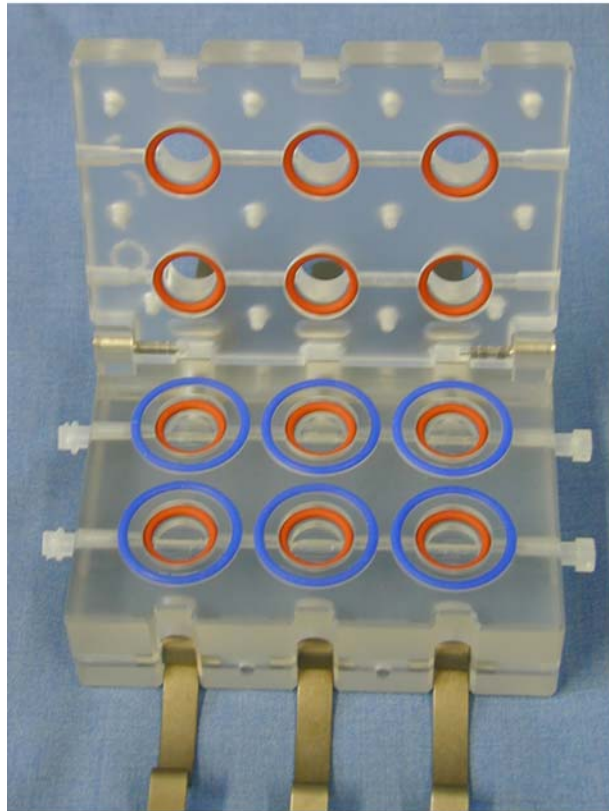
Bei der Konstruktion der Druckkammer mussten Voraussetzungen, die aus den grundlegenden Eigenschaften des Knorpels resultieren, ebenso berücksichtigt werden, wie die mögliche Implantation des in vitro erzeugten Gewebes in ein Gelenk. Das Transplantat muss sich während der mechanischen Belastung in der Druckkammer in einem der Gelenkflüssigkeit möglichst ähnlichem Medium befinden, das ständig erneuert werden kann. In der Kammer muss während der gesamten Zeit eine konstante Temperatur von näherungsweise 37°C herrschen. Die mechanische Belastung sollte der des natürlichen Gelenkes möglichst ähnlich sein, variiert werden können und bestimmbar sein. Weiterhin muss die Kammer sterilisiert und der Innenraum der Kammer über die gesamte Zeit des Versuches steril gehalten werden können.

Ausgangspunkt für die Konstruktion war dabei die kommerziell verfügbare Gradientenkammer der Fa. Minuth (Bad Abbach). Diese Kammer, die eigentlich für eine Monolayerkultur gedacht ist, wurde im Rahmen einer Doktorarbeit (Hillenbrand 2001) wie im folgendem beschrieben, modifiziert (Abb. 1 - 3).

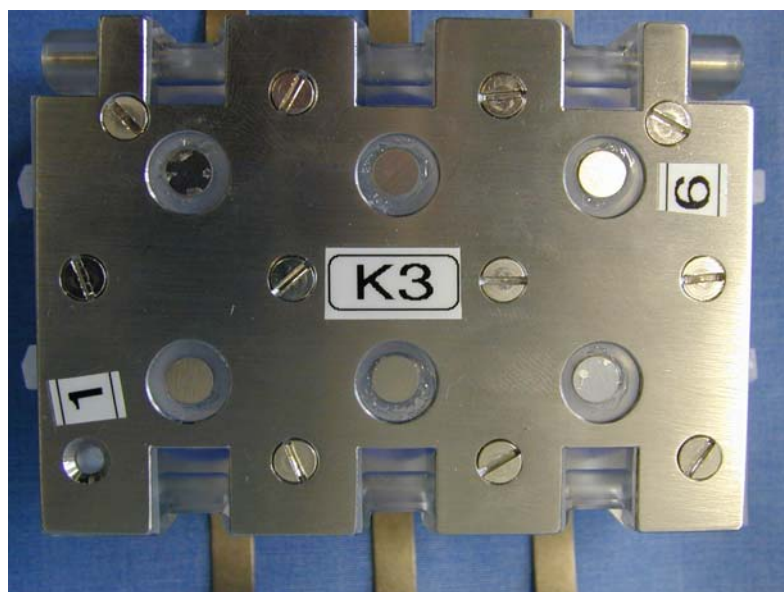
**Abb. 1** Skizze der angewandten Versuchskammer



**Abb. 2** Blick in die geöffnete Kammer mit entfernter Abschlussfolie



**Abb. 3** Blick auf die geschlossene Kammer



Die Transplantate werden auf den Boden der Versuchskammer gestellt und ggf. mit unterlegten Silikonscheibchen abgestützt. Es können je sechs Transplantate pro Kammer eingesetzt werden, je drei werden dabei in Reihe perfundiert. Über den Transplantaten befindet sich ein Plexiglaszylinder, der den Anpressdruck der Druckstempel auf die Abschlussfolie an das Transplantat weiterleitet. Die Kammer wurde nach oben durchbohrt, die unteren Perfusionskanäle verschlossen. Die Abschlussfolie selbst besteht aus 0,1 cm dickem Edelstahl, der eine ausreichende Eigenflexibilität aufweist. Fixiert wird die Folie durch eine verschraubte Andruckplatte aus V2A Edelstahl. Zwischen Edelstahlfolie und Gehäuse befindet sich dabei an den Auflagestellen noch eine 0,1 cm starke Silikonfolie zur Verbesserung der Dichtung und Flexibilität.

Vier derart modifizierte Kammern stehen auf einer Heizplatte (Fa. Novodirect). Diese wiederum befindet sich in einem Stahlrahmen, der am oberen Ende über den Kammern auf einer Aluminiumplatte 24 Pressluftdruckzylinder (Fa. Bürklin, München) aufnimmt. Der dabei auf die Kammern wirkende Druck ist über den Ausgangsdruck des Pressluftanschlusses regelbar und wurde auf 0,5 MPa eingestellt. Die Zuführung der Pressluft in die Druckzylinder erfolgt über vier Ventile, so dass vier unterschiedliche Druckfrequenzen einstellbar sind. Die Zylinder besitzen eine Rückstellfeder, die im Intervall eine druckfreie Phase der Transplantate gewährleisten. Die Steuerung erfolgt durch einen programmierbaren Mikrocomputer (Fa. Conrad). Neben einem unbelasteten Kontrolltransplantat wurden für die Versuchstransplantate 1 Sekunde Belastung bei 1 Sekunde Entlastung (0,5 Hz), 2 Sekunden Belastung bei 8 Sekunden Entlastung (0,1 Hz) und 20 Sekunden Belastung bei 80 Sekunden Entlastung (0,01 Hz) gewählt.

Bei dieser Konstruktion erfolgt die Perfusion mit 1ml/h durch eine Rollerpumpe (Fa. Ismatec) im zur Umgebung hin durch Mikrofilter (0,2  $\mu$ Meter, Fa. Braun) offenen Kreislauf. Die gesamte Anlage wurde zweckmäßigerweise auf dem zur Kühlung (4°C) des Mediums (Dulbeco's MEM Medium unter Zusatz von 10 % FKS (Fa. Seromed) und 80 mg Gentamycin/500 ml) eingesetzten Kühlschranks aufgebaut (Abb. 4).

**Abb. 4** Versuchsaufbau im Betrieb



## **2.2. Gewebekultur**

### **2.2.1. Gewinnung von Chondrozyten aus Schweineknorpel**

Von frisch geschlachteten, sechs bis acht Monate alten Mastschweinen des Schlachthofes München konnte je ein ungeöffnetes Kniegelenk entnommen werden. Dieses wurde sofort unter sterilen Bedingungen geöffnet und Knorpel sowohl von den Femurkondylen, wie auch vom Tibiaplateau und der Patella entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden auch diese in Dulbecco's MEM-Medium (Fa. Gibco-BRL, Deisenhofen), versetzt mit 80 mg/500 ml Gentamycin (Refobacin, Fa. Merck, Darmstadt), bei 37° C aufbewahrt.

### **2.2.2. Aufarbeitung des Gelenkknorpels**

#### **2.2.2.1. Chondrozytenisolierung**

Die gewonnenen Knorpelstücke wurden in Petrischalen steril von allen noch anhaftenden Fremdgewebe gereinigt und mit einem Skalpell in kubische Stücke von 1 bis 3 mm Kantenlänge zerkleinert. Dabei wurde die Knorpeloberfläche mit Flüssigkeit benetzt, um ein oberflächliches Austrocknen zu vermeiden. Die so

gewonnenen Knorpelstückchen wurden 12 bis 16 Stunden auf einem Magnetrührer in Kolben-Flaschen bei langsamer Rührbewegung im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit in Enzymlösung inkubiert. Die Enzymlösung bestand aus serumfreien Dulbecos's MEM Medium, versetzt mit 0,15 mg/ml DNase Typ II (Fa. Paesel, Frankfurt), 0,1 mg/ml Hyaluronidase (Fa. Sigma, Deisenhofen) und 2 mg/ml Kollagenase Typ II (Fa. Seromed, Berlin). Nach Zubereitung einer größeren Menge Enzymlösung wurde diese mit Filtern der Porengröße 45 und 22 µm (Falcon Schubert&Weiss, München) steril gefiltert und nach Aufteilung in gebrauchsfertige Portionen von je 40 ml eingefroren.

Im Anschluss an die Inkubation in Enzymlösung wurde die Suspension durch einen Filter mit 50 µm Porengröße (Falcon Schubert&Weiss, München) in ein 50 ml Polypropylen Röhrchen, (Schubert&Weiss, München) pipettiert. Um die maximale Zellzahl zu gewinnen, wurden die Inkubationsflasche und die Pipette sorgfältig mit frischem Kulturmedium nachgespült. Die filtrierte Suspension wurde bei 1200 U/min für 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig dekantiert und das Zellpellet in 10 ml Vollmedium (Dulbeco's MEM-Medium versetzt mit 10% FKS (Fa. Seromed, Berlin) und 80 mg/500 ml Gentamycin) resuspendiert.

#### 2.2.2.2. Vitalitätsbestimmung und Zellzahlermittlung

Die Zellzahl wurde mit der Zählkammermethode nach Neubauer und die Zellvitalität nach der Trypan-Blau-Methode bestimmt.

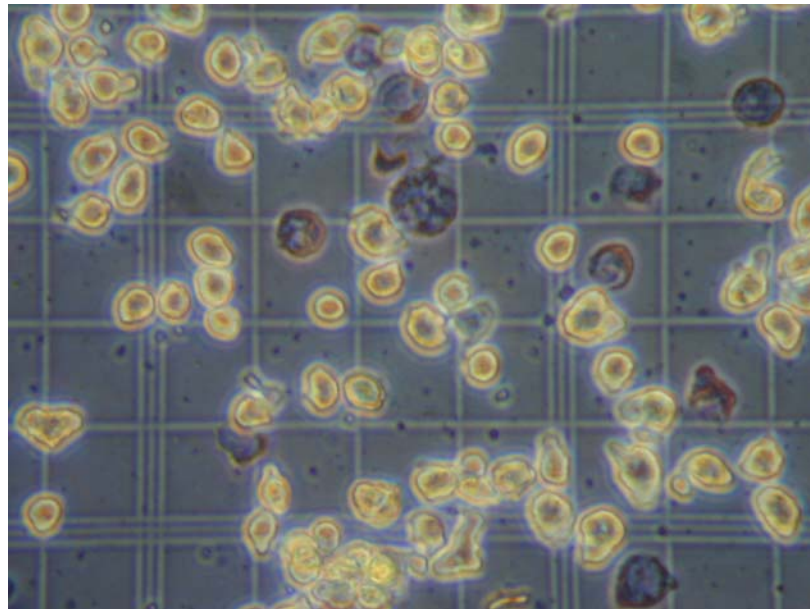
Das Prinzip der Trypan-Blau-Methode zur Bestimmung der Vitalität beruht darauf, dass Trypan-Blau von vitalen Zellen nicht aufgenommen wird, geschädigte oder avitale Zellen von diesem Farbstoff aber tiefblau gefärbt werden.

10 µl der auszuzählenden Zellsuspension werden mit 10 µl Trypan-Blau (Fa. Fluka, Neu-Ulm) gemischt und mit einer Pipette in eine Neubauer Zählkammer (MD-Kova-Raster, Madaus, Köln) eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop wird zur Vitalitätsbestimmung der relative Anteil der vitalen Zellen bestimmt (Abb. 5).

Um die Zellzahl in der Zellsuspension abschätzen zu können, wurden die vitalen Chondrozyten in einem Quadranten der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die erhaltene Zellzahl wurde mit der Milliliteranzahl der Zellsuspension, der Vitalität in

Prozent und dem Faktor  $2 \times 10^4$  multipliziert, um die vitale Gesamtzellzahl zu erhalten.

**Abb. 5** Vitalitätsbestimmung von Chondrozyten in der Neubauer Zählkammer



### 2.2.3. Amplifikation in Monolayerkultur

Die Zellen wurden im Vollmedium in Zellkulturflaschen in einer relativen Dichte von ca. 40.000 Zellen/cm<sup>2</sup> eingebracht. Die Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (Fa. Nunk, Dänemark) wurden mit ca.  $3 \times 10^6$  Zellen in 20 ml Vollmedium befüllt und im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am zweiten Tag zeigte sich dabei eine Anheftung der Zellen am Boden der Kulturflaschen. Alle drei Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Das Medium wurde hierzu komplett abpipettiert und sofort durch 10 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. Nach Zentrifugation des alten Mediums (2400 U/Min für 10 Min.) wurden 10 ml des Überstandes in die Kulturflasche zurückpipettiert.

Nach Konfluenz der Zellen fand die Separierung der Kulturen statt.



#### 2.2.4. Separation der Zellen aus der Monolayerkultur

Für das Ablösen der Zellen musste das Kulturmedium möglichst vollständig mit der Pipette abgezogen werden. Um sicher zu gehen, dass alles enzyminhibierende Medium entfernt wurde, wurde die Kulturflasche noch zweimal mit PBS (Apotheke Klinikum Großhadern, München) nachgespült. PBS Puffer pH 7,4 besteht aus Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat 14,8 g, Kaliumdihydrogenphosphat 2,3 g, Natriumchlorid 90 g in 1,0 l Aqua dest.. Anschließend erfolgte für sieben Minuten die Inkubation mit 2 ml vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung 0,05 % (Fa. Sigma, Deisenhofen) im Brutschrank zur Lösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche. Die Inhibition des Enzyms wurde durch Zugabe von 10 ml Vollmedium durchgeführt. Durch sanftes Anstoßen der Kulturflasche ließen sich restliche, noch anhaftende Zellen zusätzlich ablösen. Die Suspension wurde abpipettiert und bei 1200 U/Min für zehn Minuten (ohne Bremse) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet konnte nun resuspendiert und erneut in Kulturflaschen eingebracht oder zum Besatz der Transplantate verwendet werden.

#### 2.2.5. Gewinnung und Präparation von Knochenmarkstammzellen

Es wurden Zellen aus den Beckenknochen freiwilliger Spender entnommen. In der Orthopädie müssen häufiger Spongiosa oder kortikospongiöse Späne aus dem Beckenknochen zur Defektdeckung an anderen Stellen entnommen werden. Hierzu wird regelhaft der Beckenkamm eröffnet, so dass die zusätzliche Aspiration kleiner Mengen Knochenmarkes keinen signifikanten Zusatzeingriff darstellt.

Entsprechend wurden die Patienten nach prinzipieller Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission München mit dem im Anhang beigefügten Informations- und Aufklärungsbogen um Zustimmung gebeten.

Nach Hautschnitt und vor Eröffnung des Beckenkammes wurde mit einer Knochenmarkaspirationsnadel wiederholt in den Beckenkamm eingestochen und jeweils 5 ml Knochenmark aspiriert bis zur Endmenge von 50 ml. Dieses wurde sofort in ein mit Heparin-Lösung gespültes Gefäß gegeben und gut vermischt. Bis zur Aufarbeitung erfolgte die Lagerung bei 4° C im Kühlschrank.

Das Aspirat wurde nun auf vier je 40 ml Polypropylen-Röhrchen verteilt und mit Hanks-Lösung (8 g/l NaCl, 400 mg/l KCl, 1 g/l Glucose, 60 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 47,5 mg/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 170 mg/l Phenol-Rot, Apotheke Großhadern) auf je 20 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde bei 168 g (900 U/Min, 10 Minuten) zentrifugiert, 12 ml des Überstandes abpipettiert und mit PBS pH 7,4 auf 10 ml aufgefüllt. Je 10 ml Ficoll (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurden nun in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen gegeben und mit der verdünnten Knochenmarksuspension langsam überschichtet. Im Anschluß erfolgte die Zentrifugation bei 400 g (1300 U/Min) für 30 Min. Die daraufhin ausgebildete Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation (1100 U/Min, 10 Minuten) wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet resuspendiert. War der Erythrozytenanteil sichtlich hoch, wurde nach Resuspension noch mit 5 ml Erylysepuffer (8,29 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, 37,2 mg EDTA-Na<sub>2</sub> in 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,2-7,4, Apotheke Großhadern) für fünf Minuten inkubiert, anschließend mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert, sowie der Überstand abpipettiert und das Zellpellet resuspendiert. Die Zellen konnten gezählt und in die Transplantate eingebracht werden. Uns ist dabei klar gewesen, daß ohne weitere Separation in diesem Zellgemisch nur ein kleiner Teil tatsächlicher mesenchymaler Stammzellen vorlag.

## 2.2.6. Implantation der Zellen auf das Trägermaterial

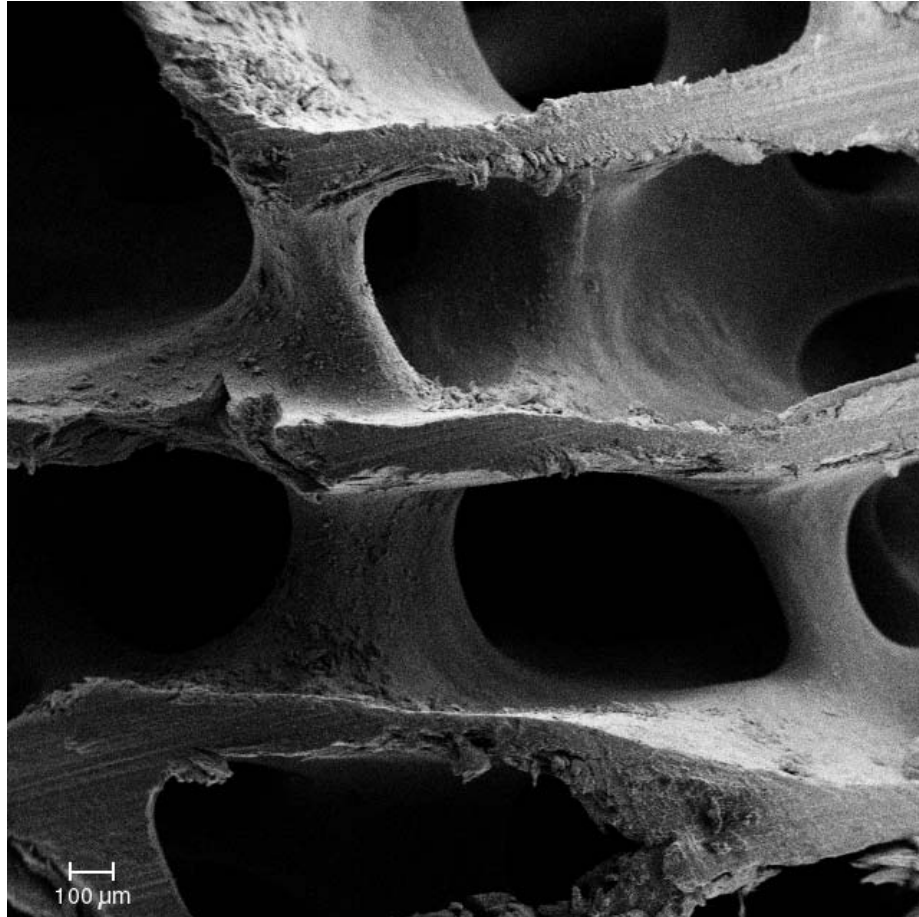
### 2.2.6.1. Präparation von Spongiosazylinder und Zellimplantation

Da in menschlichen und tierischen Spongiosazylindern aufgrund einer erheblichen technisch bedingten Zytotoxizität kein Chondrozytenwachstum erzielt werden konnte (Hillenbrand 2001), wurden kommerziell gefertigte Implantate (Tutoplast<sup>®</sup>, Fa. Tutogen, Neunkirchen) verwendet. Die Spongiosazylinder stammten von Rindern. Die Spongiosadübel hatten einen Durchmesser von 7 mm und eine Länge von 10 mm (Abb. 6).

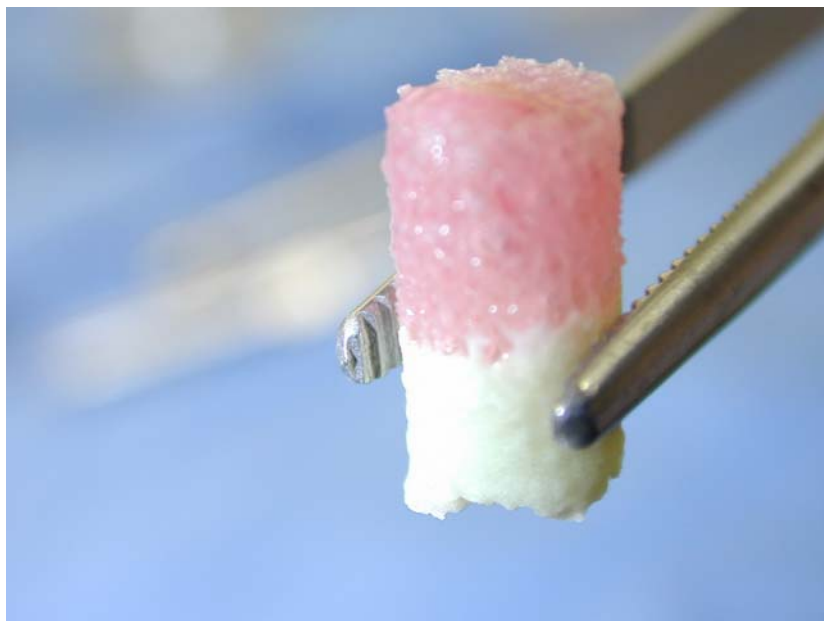
Die nach Zellseparation gewonnene Zellsuspension wurde nun nach Vitalitätsprüfung und Zellzählung mit einer identischen Menge von autoklavierter 4% Agaroselösung (Fa. Novex, Frankfurt) vermischt. Die Zelldichte betrug etwa  $10 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Spongiosazylinder wurden in ein 10 ml Polypropylen-Röhrchen eingestellt und mit dem Agarosezellgemisch überpipettiert. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation (500 U/Min, 1 Minute), um die dickflüssige

Suspension vollständig in die Träger eindringen zu lassen. Die Polymerisation der Agarose erfolgte bei 4° C im Kühlschrank für 30 Minuten (Abb. 7).

**Abb. 6** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Oberflächenstruktur der Tutoplast® Zylinder



**Abb. 7** Spongiosazylinder vor Einspannung in die Versuchskammer



#### 2.2.6.2. Präparation von Vliesmaterial und Zellimplantation

Da sich bei den Versuchen mit Spongiosa nur ein unbefriedigendes Wachstum der Zellen in ersten histologischen Schnitten zeigte, wurde für die weiteren Versuche Ethisorb<sup>®</sup> 210 (Fa. Ethicon, Norderstedt) verwendet. Das Vlies ist ein resorbierbares Material, ein Copolymer aus Polyglaktin 910 (Poly-L-Glykol und Poly-L-Laktid 9:1, Vycril<sup>®</sup>) und Poly-p-Dioxanon (PDS<sup>®</sup>). Dieses ungewebte Material wird in einem Zeitraum von etwa sechs bis zwölf Wochen hydrolytisch abgebaut und vollständig resorbiert. Das Vlies wurde in Stücke von ca. 4 mm Höhe und ca. 8 mm Durchmesser geschnitten (Abb. 8 und 9).

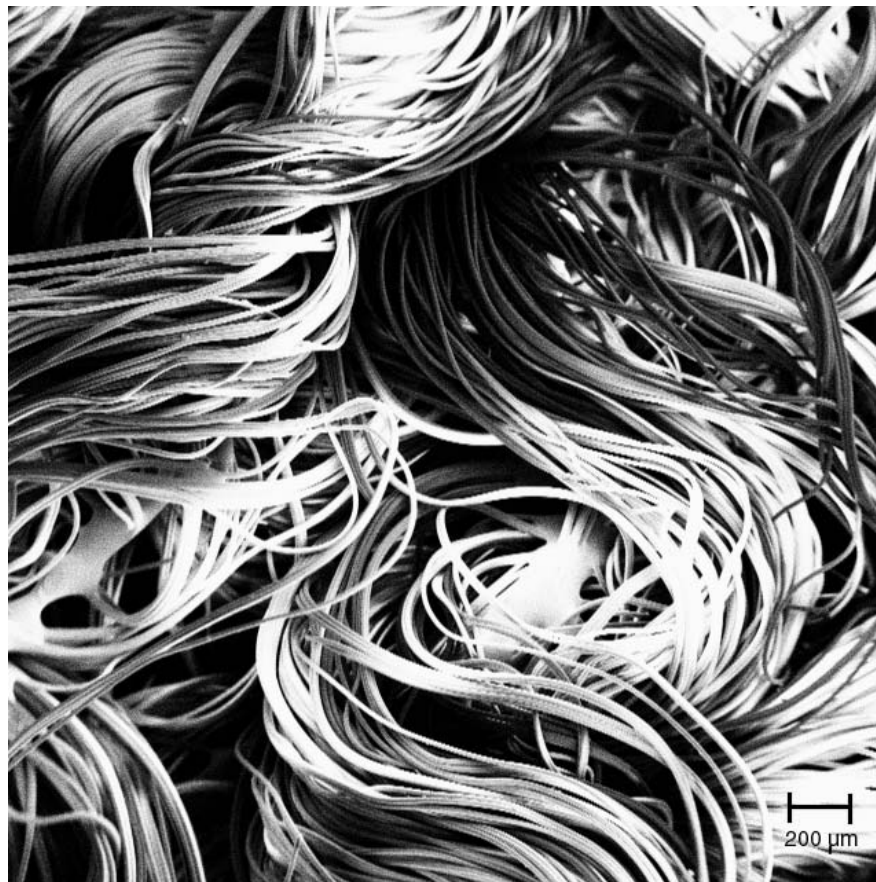
Nach Plasmasterilisation des Vlieses wurde die Agarose-Zell-Suspension mehrfach über das Vlies pipettiert und anschließend noch einmal zentrifugiert (500 U/Min, 2 Minuten). Die Auspolymerisation erfolgte wiederum bei 4 °C für 30 Minuten.

Für die Experimente mit humanen Stammzellen wurde ein langsamer degradierendes Vlies (Poly-L-Laktid/Polyglykolid Copolymer 9:1, iTV Denkendorf) verwendet. Auch dieses Vlies wurde in ca. 8 mm durchmessende Abschnitte geformt. Zur Erzielung einer Höhe von ca. 5 mm mußten acht Vliesschichten übereinander gelegt werden. Die Zellsuspension wurde dabei Lage für Lage eingebracht.

**Abb. 8** Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies nach Zuschnitt



**Abb. 9** Rasterelektronenmikroskopisches Bild des nativen Vlieses



### 2.3. Versuchsaufbau

In der Versuchskammer wurde bei einem axialen Druck von 0,5 MPa entsprechend Tabelle 1 und 2 verfahren.

**Tabelle 1** Mechanische Parameter der Versuchskammer

#### Chondrozyten

<i>Ohne Druck</i>	2 Wochen	6 Wochen	12 Wochen
<i>20 sec Druck / 80 sec Pause (0,01 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	12 Wochen
<i>2 sec Druck / 8 sec Pause (0,1 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	12 Wochen
<i>1 sec Druck / 1 sec Pause (0,5 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	12 Wochen

**Tabelle 2** Mechanische Parameter der Versuchskammer

**Humane Knochenmarkstammzellen**

<i>Ohne Druck</i>	2 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	12 Wochen
<i>20 sec Druck / 80 sec Pause (0,01 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	12 Wochen
<i>2 sec Druck / 8 sec Pause (0,1 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	12 Wochen
<i>1 sec Druck / 4 sec Pause (0,2 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	12 Wochen
<i>1 sec Druck / 1 sec Pause (0,5 Hz)</i>	2 Wochen	6 Wochen	9 Wochen	12 Wochen

**2.4. Histologische Präparation**

2.4.1. Fixierung

Die Fixation der Spongiosazylinder nach Entnahme aus den Versuchskammern erfolgte durch Methanol, die Präparate blieben mind. 24 Stunden in der Fixationslösung. Alle Vliespräparate wurden als Gefrierschnitte mit Einbettung des Materials in Jung Gefriermedium (Fa. Leica, Nussloch) verarbeitet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Gefrierschnitt der Vliespräparate wurden diese zur Rehydratation mit PBS und Tween 20 (Polyoxyethylen Sorbit Monolaureat 0,1 % in PBS, Sigma) als Detergenz für fünf Minuten behandelt. Die Fixation und gleichzeitige Inaktivierung der endogenen Peroxidase fand dann für 30 Minuten in Methanol, versetzt mit 30 % Wasserstoffsuperoxid (100 ml Methanol und 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), statt, bevor die Gefrierschnitte noch einmal für 15 Minuten in PBS und Tween gewaschen wurden.

2.4.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Präparate wurden mit Gefriermedium auf einem runden Präparathalter aufgefroren und in einem Kryomikrotom (HM 500 OMV) bei  $-28^{\circ}\text{C}$  geschnitten. Nach der Ausrichtung der Schnittebene erfolgten zunächst Trimmschnitte von einer Dicke von 40  $\mu\text{m}$  bis in den für die Untersuchung relevanten zentralen Teil. Wenn

dieser Bereich makroskopisch erkennbar war, wurde die Schnittstärke auf 14 µm reduziert, Serienschnitte angefertigt und alle Schnitte auf Superfrost-Plus Objektträger (Menzel, München) aufgebracht.

#### 2.4.3. Hämatoxylin und Hämatoxylin/Eosin Färbungen

Zur orientierenden Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Färbung angewandt. Die auf dem Objektträger befindlichen Schnitte wurden für 20 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung eingelegt. Anschließend wurden sie mit Leitungswasser abgewaschen und in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %), sowie Xylol I/II für je fünf Minuten zum Entwässern eingelegt. Zur Eindeckung diente Eukitt<sup>®</sup> (Fa. Kindler, Freiburg). Im Falle einer zusätzlichen Eosin-Färbung erfolgte nach der Differenzierung in Leitungswasser die Überfärbung mit Eosin (0,1% in Aqua dest.) für 5-10 Minuten. Nach einer weiteren Differenzierung in Leitungswasser wurde die Entwässerung und Eindeckung wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 2.4.4. Immunhistochemische Untersuchung

##### 2.4.4.1. Antikörper

Zur qualitativen Charakterisierung der kollagenen Matrix wurden die in Tab. 3 aufgeführten monoklonalen Antikörper verwendet.

Alle Präparate wurden hinsichtlich der Verteilung von Kollagen I und Kollagen II untersucht, weitere Antikörperuntersuchungen wurden zusätzlich nur bei Präparaten mit im zeitlichen Verlauf wesentlich differenter Morphologie vorgenommen.

**Tabelle 3** Zur Immunhistochemie verwendete Antikörper

Antigen	Primär-antikörper	Verdünnung	Tier	Enzym-vorbehandlung	Quelle	Referenz
Kollagen I	Col 1	1:2000	Maus	Hyal (1,5 IU/ml) und ChABC(0,25 IU/ml)	Sigma	
Kollagen II	CIICI	1:6	Maus	Hyal (1,5 IU/ml) und ChABC(0,25 IU/ml)	DSHB	(Holmdahl, 1986)
Kollagen III	4H12	1:500	Maus	Hyal (1,5 IU/ml) und ChABC(0,25 IU/ml)	ICN	
Chondroitin -4-sulphat + Dermatan sulphat	2B6	1:1500	Maus	ChABC (0,25 IU/ml)	B. Caterson	(Caterson, 1985)
Chondroitin -6-sulphat	3B3	1:200	Maus	ChABC(0,25 IU/ml)	B. Caterson	(Caterson, 1985)
Keratan-sulphat	5D4	1:1500	Maus	Keine	B. Caterson	(Caterson, 1983)

Abkürzungen: ChABC – Chondroitinase ABC, Hyal - Hyaluronidase

#### 2.4.4.2. Technik der Immunfixation und Färbung

Die Immunhistochemie dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen oder Glykosaminoglykanen, die in einer Antigen-Antikörper-Reaktion die jeweils entsprechenden Antikörper binden. Zum Nachweis der Primärantikörper wurde das Vectastain DAB-Kit Elite (Vector Labs, Burlingame, CA) verwendet. Die einzelnen Schnitte wurden auf ihren Objektträgern mit Dako-Pen (Sigma) umrandet, um ein Verlaufen der zur Färbung notwendigen Reagenzien zu verhindern. Dies war aufgrund der Tatsache notwendig, dass ein Objektträger mit jeweils zwei Schnitten versehen war, an denen unterschiedliche Markierungen (mit verschiedenen Primärantikörpern) durchgeführt wurden. Nach Rehydratation der Schnitte in PBS und Tween 20 für fünf Minuten erfolgte die 30 minütige Inkubation im Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ansatz zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase. Danach wurden sie für 3 x 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Anschließend fand nun die enzymatische Behandlung mit Chondroitinase ABC bzw. zusätzlich Hyaluronidase (siehe Tabelle 3) für 30 Minuten im Brutschrank bei 37° C zur Freilegung der verschiedenen Epitope statt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation



mit Pferdeserum (1:20 in PBS, Vector Lab, Burlingame, CA) für 60 Minuten abgesättigt. Nach dem Abschütteln des Serumüberstandes wurde sofort mit dem Auftrag geeigneter Primärantikörper (siehe Tabelle 3) zur immunhistochemischen Markierung begonnen. Es kamen hierbei folgende monoklonalen Antikörper zum Einsatz, Col 1 (Verdünnung 1:2000) zur Darstellung von Kollagen I, CIIC1 (Verdünnung 1:6) für Kollagen II und 4H12 (Verdünnung 1:500) für Kollagen III. Zur Erkennung der Glykosaminoglykane (GAGs) wurden die monoklonalen Antikörper 2B6 (Verdünnung 1:1500) für Chondroitin-4-sulphat + Dermatansulphat, 3B3 (Verdünnung 1:200) für Chondroitin-6-sulphat, sowie 5D4 (Verdünnung 1:1500) für Keratansulphat verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur war ein 3 x 5 minütiger Waschvorgang in PBS-Tween notwendig. Im Anschluß daran wurde der Sekundärantikörper aufgetragen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen und dann wieder 3 x 5 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem zuvor angesetzten ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) fand ebenfalls bei Raumtemperatur für 30 Minuten statt. Nach dem letzten Waschschrift (3x5 Minuten) lief die Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin, Vector Dab – Peroxidase Substrat Kit) vier Minuten lang unter Lichtausschluss ab. Danach erfolgte das Auswaschen des Überstandes in Leitungswasser und eine Kernfärbung mit Hämatoxylin. Nach Differenzierung mit Leitungswasser, bis keine Farbschlieren mehr aufstiegen, wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %) für je fünf Minuten dehydriert. Im Anschluß wurden die Schnitte nacheinander in zwei Fraktionen Xylol eingelegt und dann mit Eukitt® eingedeckt.

## **2.5. Rasterelektronenmikroskopie**

### **2.5.1. Fixation**

Alle Präparate für die Elektronenmikroskopie wurden nach Entnahme in 2 % Glutaraldehyd in 0,053 M Natriumcacodylatpuffer (mit HCl auf pH 7,3 eingestellt) fixiert. Die Präparate blieben dabei für mindestens 24 h bei 4° C im Kühlschrank.

### 2.5.2. Präparation

Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, je 10 Minuten) entwässert und nach Azetonspülung in einem Kritisch-Punkt Trockengerät in CO<sub>2</sub> getrocknet. Alle Präparate wurden dann mittels Leitsilber auf Probenteller geklebt. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit erfolgte die Aufdampfung von Gold-Palladium im Hochvakuum (Bal-Tec S CD 050 Sputter Coater).

### 2.5.3. Untersuchungstechnik

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurde mit einem Leica S420 Gerät (Fa. Leica, Cambridge) durchgeführt. Nach Erzeugung des Hochvakuums wurde eine Feldspannung von 10 kV gewählt, der Sondenstrom betrug in der Regel 50 pA. Die Präparate wurden mit unterschiedlicher Vergrößerung digital dokumentiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse der Zellkultur

##### 3.1.1. Knorpelzellen vom Schwein

Über einen Zeitraum von zwei Monaten wurden acht verschiedene Schweinegelenke verarbeitet (Tabelle 4). Da diese Gelenke kaum arthrotische Veränderungen des Knorpels zeigten, konnten sehr viele Knorpelzellen gewonnen werden. Die Vitalität der Zellen lag immer nahezu bei 100%. Die Zellen wurden direkt für die Transplantation verwendet oder nach einer Separation neu gezählt und erst dann verwendet.

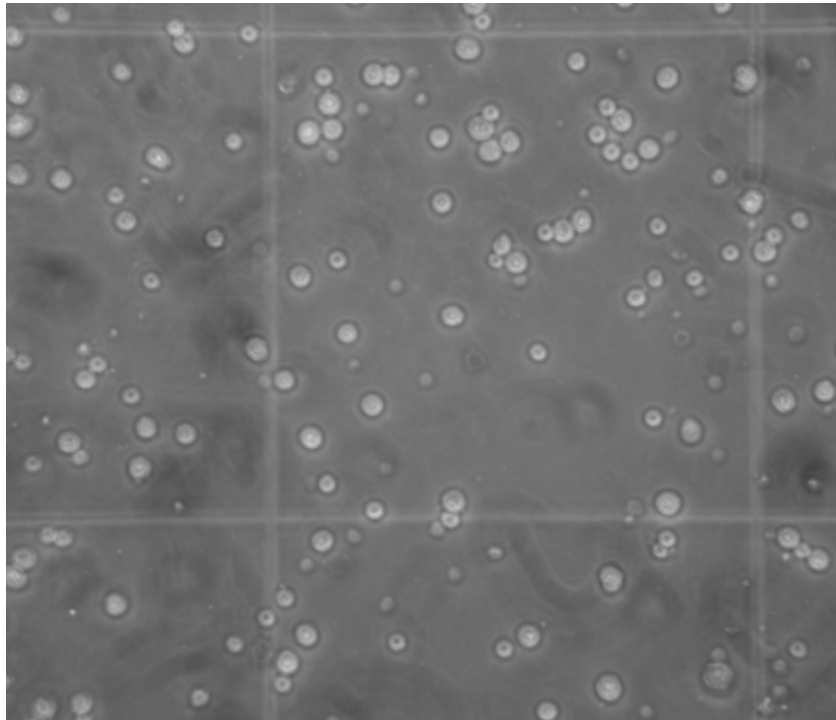
**Tabelle 4** Übersicht der verwendeten Schweinechondrozyten

Nr.	Datum	Zellzahl bei Gewinnung	Vitalität	Anzahl Separationen	Zellzahl Transplantation	Vitalität bei Transplantation	Datum Kulturende
1	14.04.00	18,4 * 10 <sup>6</sup>	100%	1	77,4 * 10 <sup>6</sup>	100%	02.05.00
2	08.05.00	108,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	-	108,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	-
3	10.05.00	96,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	-	96,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	-
4	11.05.00	96,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	1	96,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	29.05.00
5	29.05.00	123,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	-	123,0 * 10 <sup>6</sup>	100%	-
6	07.08.00	80,0 * 10 <sup>6</sup>	98%	-	80,0 * 10 <sup>6</sup>	98%	-
7	15.08.00	82,4 * 10 <sup>6</sup>	90%	-	82,4 * 10 <sup>6</sup>	90%	-
8	01.09.00	74,4 * 10 <sup>6</sup>	100%	1	62,7 * 10 <sup>6</sup>	100%	26.09.00

##### 3.1.2. Humane Knochenmarkstammzellen

Es wurden insgesamt zwei Stammzellpräparate gewonnen. Aus 50 ml Knochenmark ließen sich dabei im ersten Ansatz 84,4 x 10<sup>6</sup> und im zweiten Ansatz 82,4 x 10<sup>6</sup> Zellen gewinnen. Die Zellvitalität betrug bei beiden Ansätzen 100 % (Abb. 10). Die Implantation von beiden Stammzellpräparaten erfolgte sofort auf Vliese.

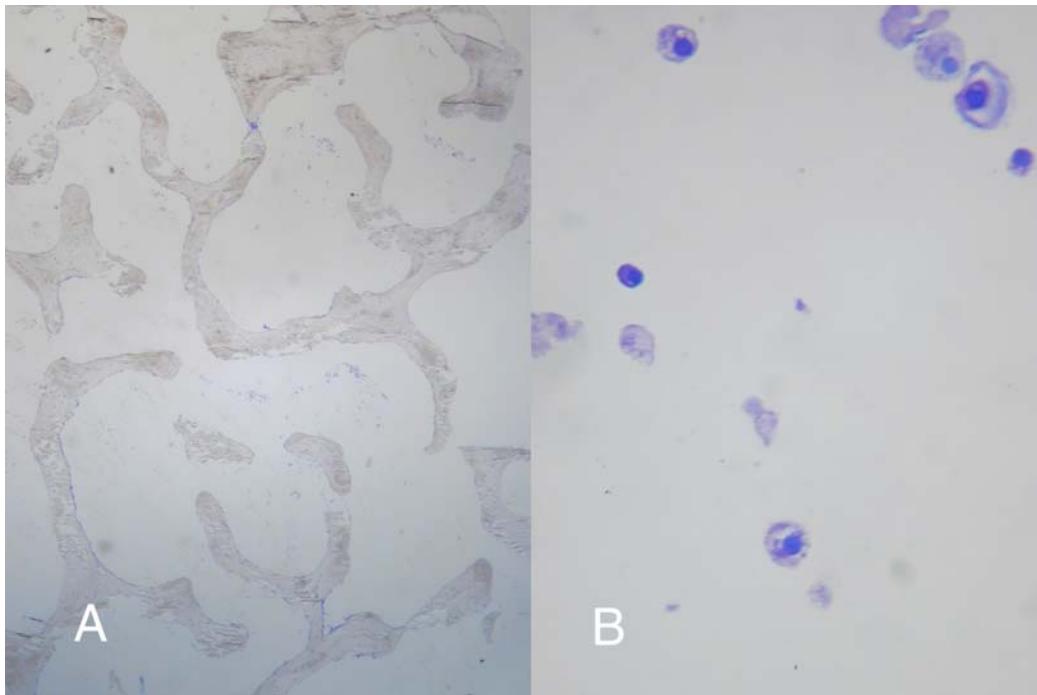
**Abb. 10** Vitalitätsprüfung eines Knochenmarkpräparates vor Implantation



### **3.2. Ergebnisse der Experimente mit Tutogen<sup>®</sup> Spongiosa als Träger**

Das Zellwachstum wurde nicht durch die in Monolayerkultur von Chondrozyten eingebrachten Spongiosazylinder beeinflusst.  $40 \times 10^6$  Zellen wurden auf vier Spongiosazylinder verteilt und in Versuchskammern eingebracht. Die Zelldichte bei Implantation lag dabei bei  $20 \times 10^6$  Zellen/ml Spongiosa. Die Transplantate wurden nach zwei Wochen Kultivierungszeit entnommen und histologisch untersucht. Es zeigten sich dabei lediglich einzelne Zellcluster zwischen den Spongiosabälkchen ohne jegliche Strukturierung oder Zeichen einer Matrixbildung (Abb. 11). Immunhistologische Färbungen konnten keinerlei Matrixproduktion nachweisen.

**Abb. 11** Humane Chondrozyten nach zwei Wochen Kultur in Tutoplast<sup>®</sup> Zylinder  
(A x 40, B x 400)



Da sich die Verwendung von Spongiosazylindern als nicht sehr effektiv erwies, wurden deshalb im weiteren resorbierbare Vliese eingesetzt.

### **3.3. Ergebnisse der Experimente mit Ethisorb<sup>®</sup> Vlies als Träger**

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt. Im ersten Ansatz erfolgte die Implantation von Chondrozyten des Schweines direkt nach enzymatischer Präparation auf die Vliese. Im zweiten Ansatz wurde vor der Implantation eine Monolayerkultur von drei Wochen mit einer Separation bis zur Ausbildung der Fibrozyten zwischengeschaltet.

Im ersten Ansatz erfolgte die Implantation von Chondrozyten aus zwei verschiedenen Tieren mit einer Zelldichte von  $40 \times 10^6$  Zellen je ml Vlies in je zwei Versuchskammern. Als Belastungsfrequenzen für die vier Kammern mit je sechs Vliesen wurden 0,5 Hz, 0,1 Hz und 0,01 Hz gewählt. Zusätzlich gab es eine unbelastete Kontrollgruppe. Es konnten Präparate nach jeweils zwei, sechs und zwölf Wochen entnommen werden. Leider kam es zu einem Ausfall des Kühlschranks, der zur Lagerung der Gefrierschnitte verwendet wurde. Deswegen stehen keine

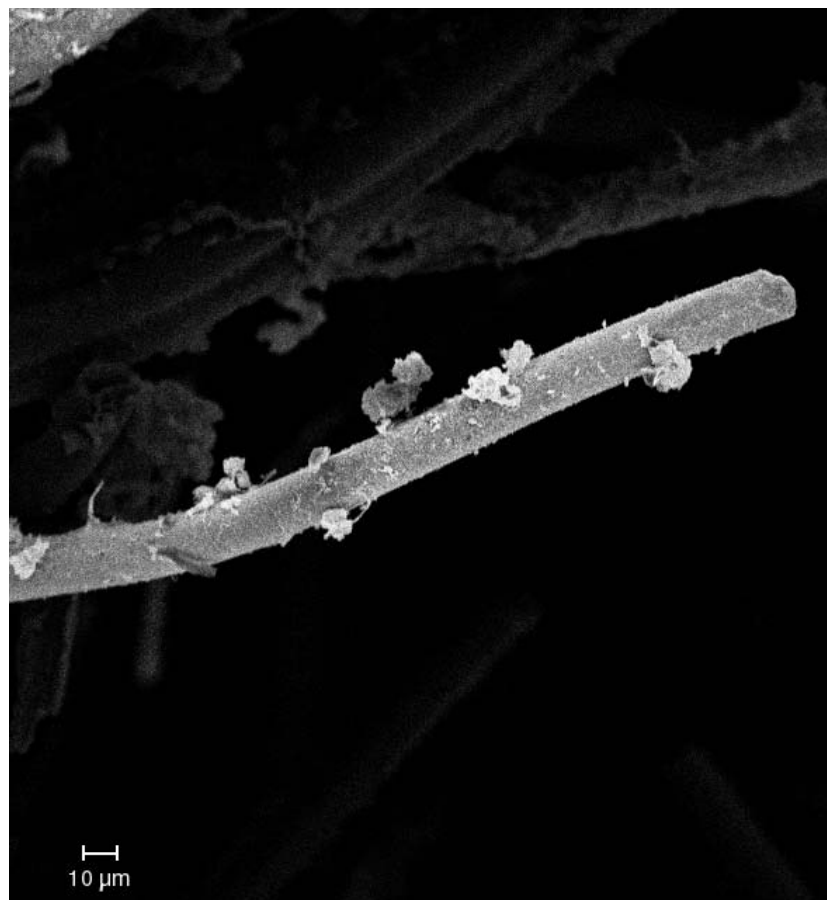
histologischen und immunhistologischen Präparate mit einer Frequenz von 0,1 Hz und ohne Druck nach sechs Wochen Generierung zur Verfügung.

Im zweiten Ansatz wurden die dedifferenzierten Chondrozyten für zwei und sechs Wochen den Frequenzen 0,5 Hz und 0,01 Hz ausgesetzt und untersucht.

### 3.3.1. Primäre Implantation der Chondrozyten

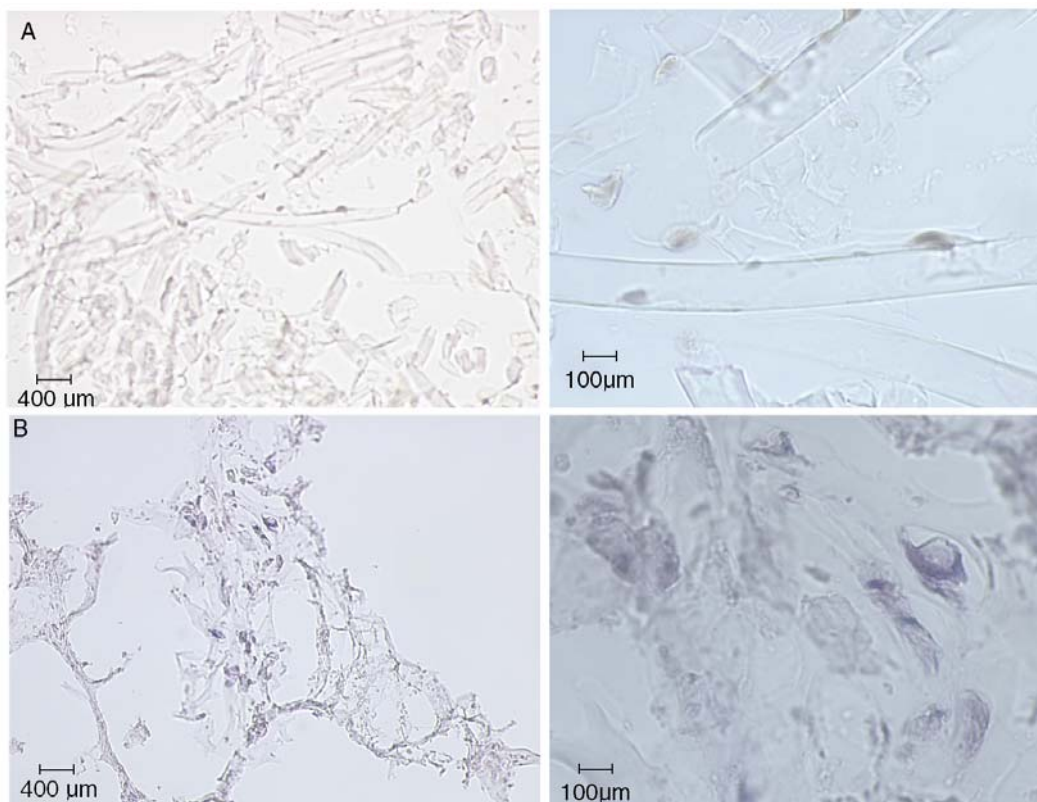
Nach direkter Implantation konnten sich Chondrozyten schon in den ersten Proben nach zwei Wochen gut an den Vliesfasern anheften (Abb. 12).

**Abb.12** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit einer Frequenz von 0,5 Hz generierten Probe nach zwei Wochen. Vliesfasern weitgehend intakt, Zellen adhären

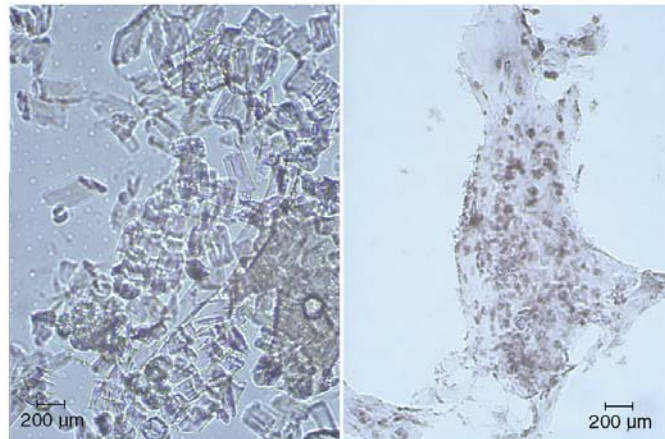


In der Hämatoxylin-Färbung hafteten die Zellen ohne Druck an den Vliesfasern gut an, produzierten aber nach zwei Wochen keine nennenswerte extrazelluläre Matrix. Nach zwölf Wochen entstand dann doch ein deutlicher Zellverbund, der jedoch keine ausgeprägte chondrogene Differenzierung aufwies (Abb. 13). Auch immunhistologisch zeigte sich nach zwei Wochen ohne Druck kein Nachweis einer kollagenen Matrixbildung, während nach zwölf Wochen sowohl Kollagen I, als auch Kollagen II nachweisbar war (Abb. 14). In der Bildung der extrazellulären Matrix bestand dabei ein Übergewicht von Kollagen II zu Kollagen I bei jedoch deutlich erkennbarer Kollagen I-Bildung.

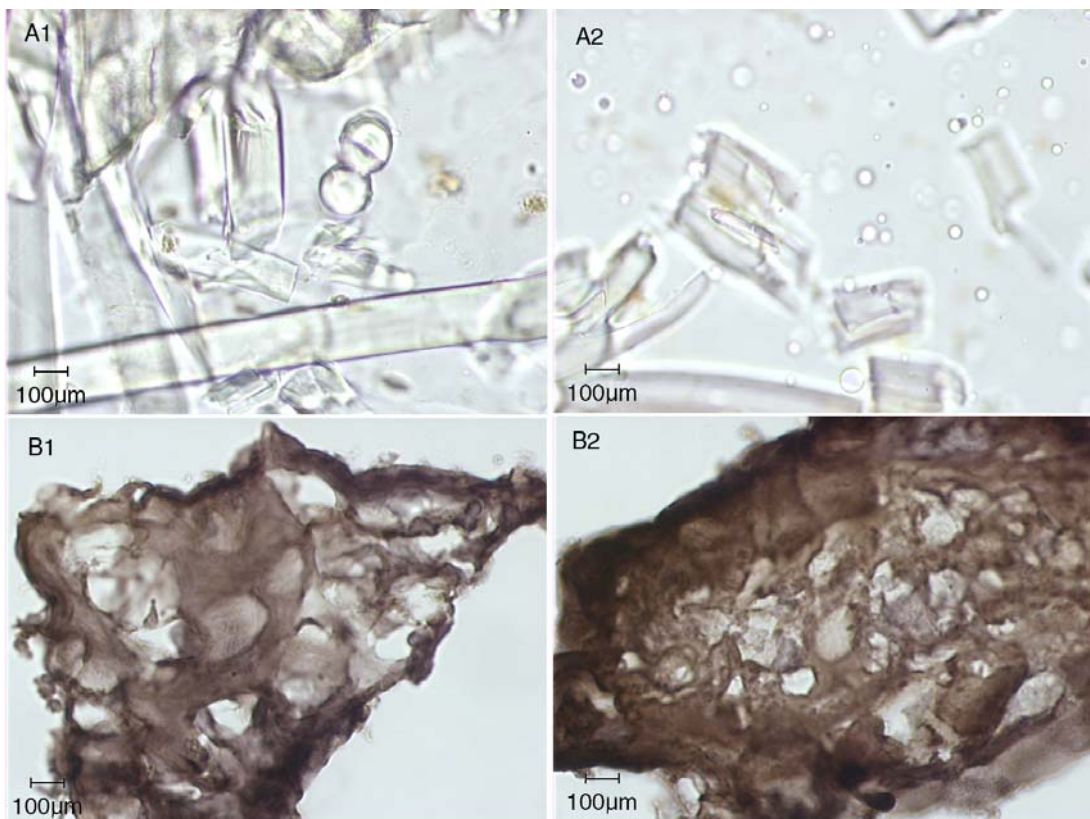
**Abb. 13** Hämatoxylin-Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies ohne Druck nach A) zwei Wochen und B) zwölf Wochen



**Abb. 14** Kollagen I (A) und Kollagen II (B) Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies ohne Druck nach 1) zwei Wochen und 2) zwölf Wochen



Kontrolle



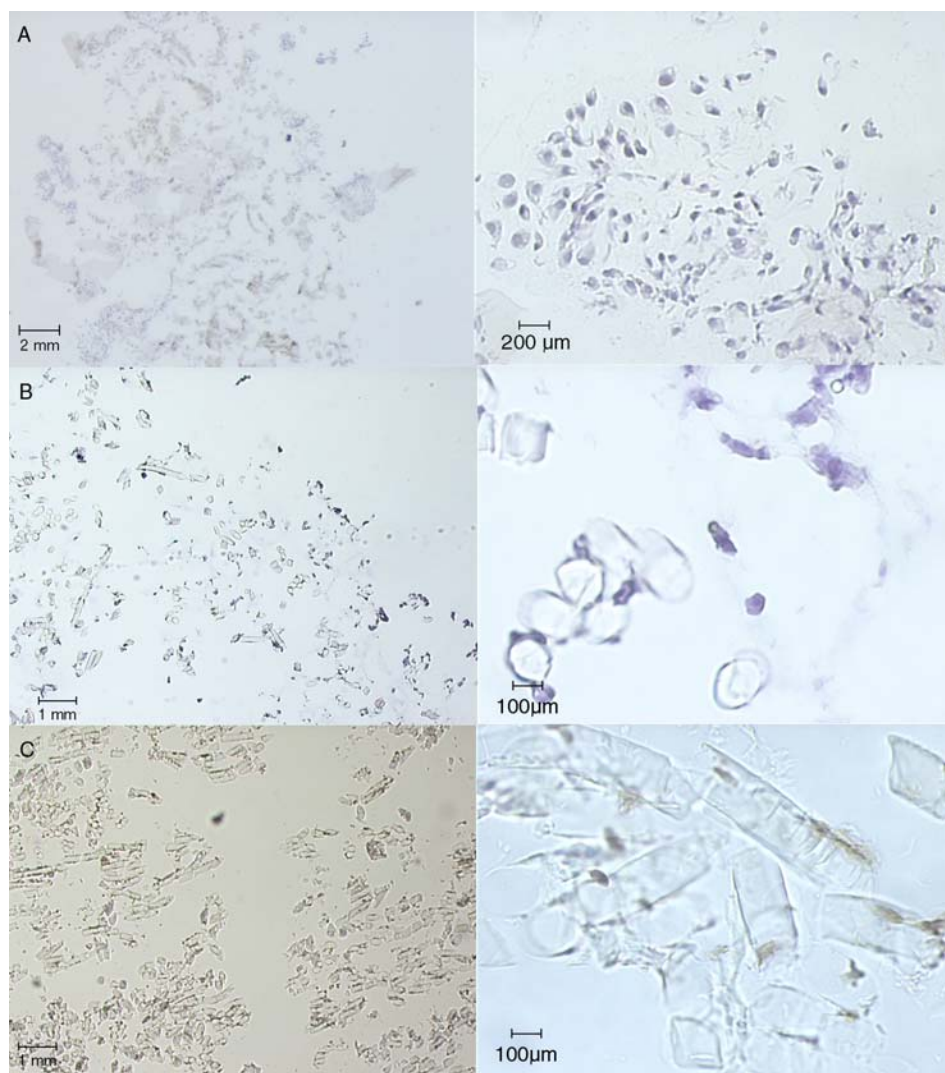


Betrachtet man dagegen die unter Druck generierten Präparate, so zeigten sich deutliche Unterschiede im Aufbau abhängig von der Druckfrequenz und dem zeitlichen Verlauf.

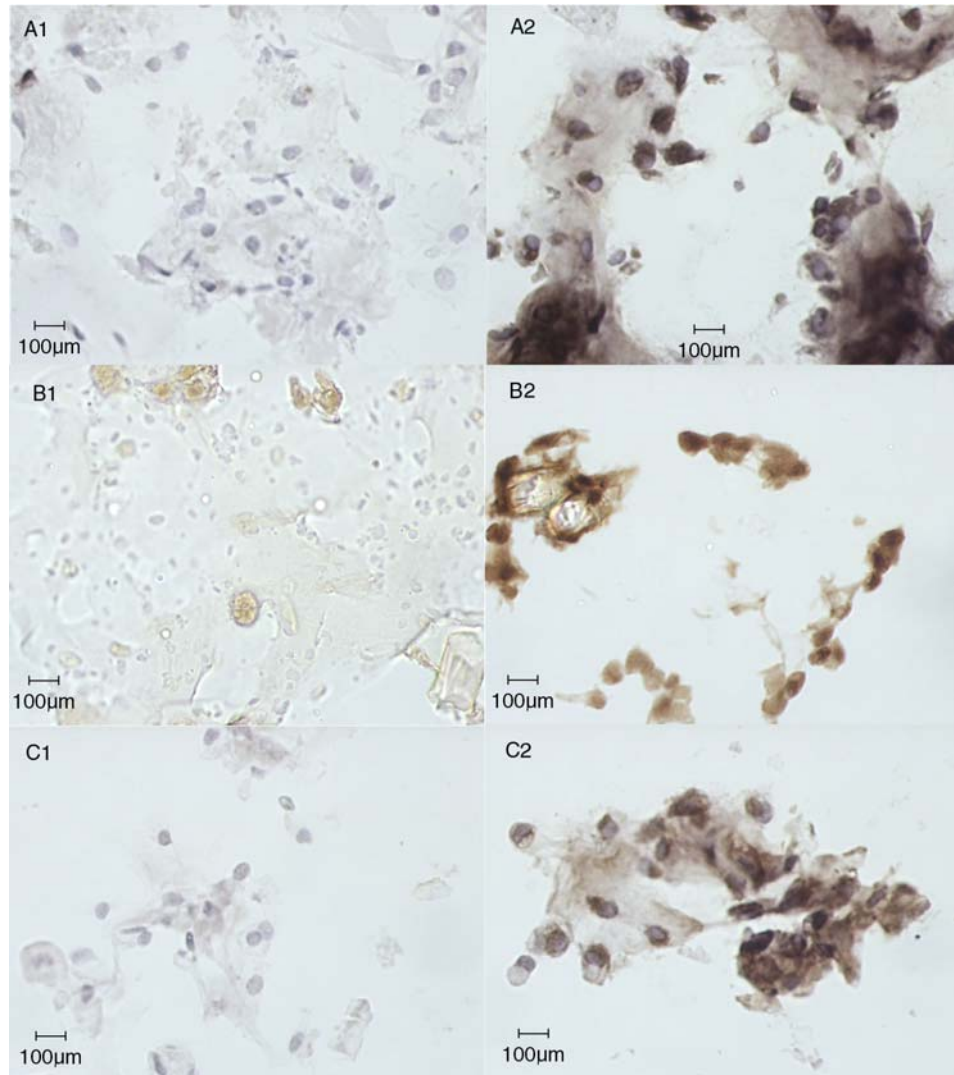
Bereits nach zwei Wochen war bei schnellster Frequenz (0,5 Hz) eine deutliche Matrixbildung vorhanden (Abb. 15). Es zeigte sich bei einer Frequenz von 0,5 Hz eine bessere Zellmorphologie der Chondrozyten als bei der langsamsten Frequenz (0,01 Hz).

Immunhistochemisch ließ sich bereits nach zwei Wochen eine deutliche Kollagen II-Bildung nachweisen (Abb. 16). Es zeigte sich kaum eine Kollagen I-Produktion, damit war das Verhältnis zwischen Kollagen I und Kollagen II zu diesem Zeitpunkt sehr günstig.

**Abb. 15** Hämatoxylin-Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies mit Druck 0,5 Hz (A), 0,1 Hz (B) und 0,01 Hz (C) nach zwei Wochen

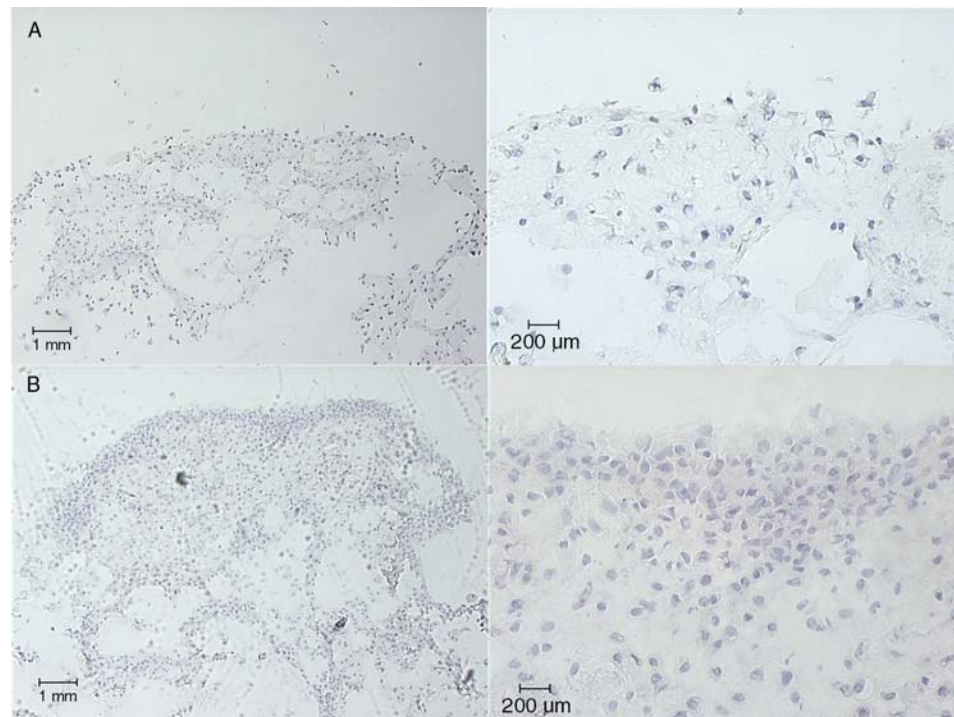


**Abb. 16** Kollagen I (1) und Kollagen II (2) Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies mit Druck 0,5 Hz (A), 0,1 Hz (B) und 0,01 Hz (C) nach zwei Wochen

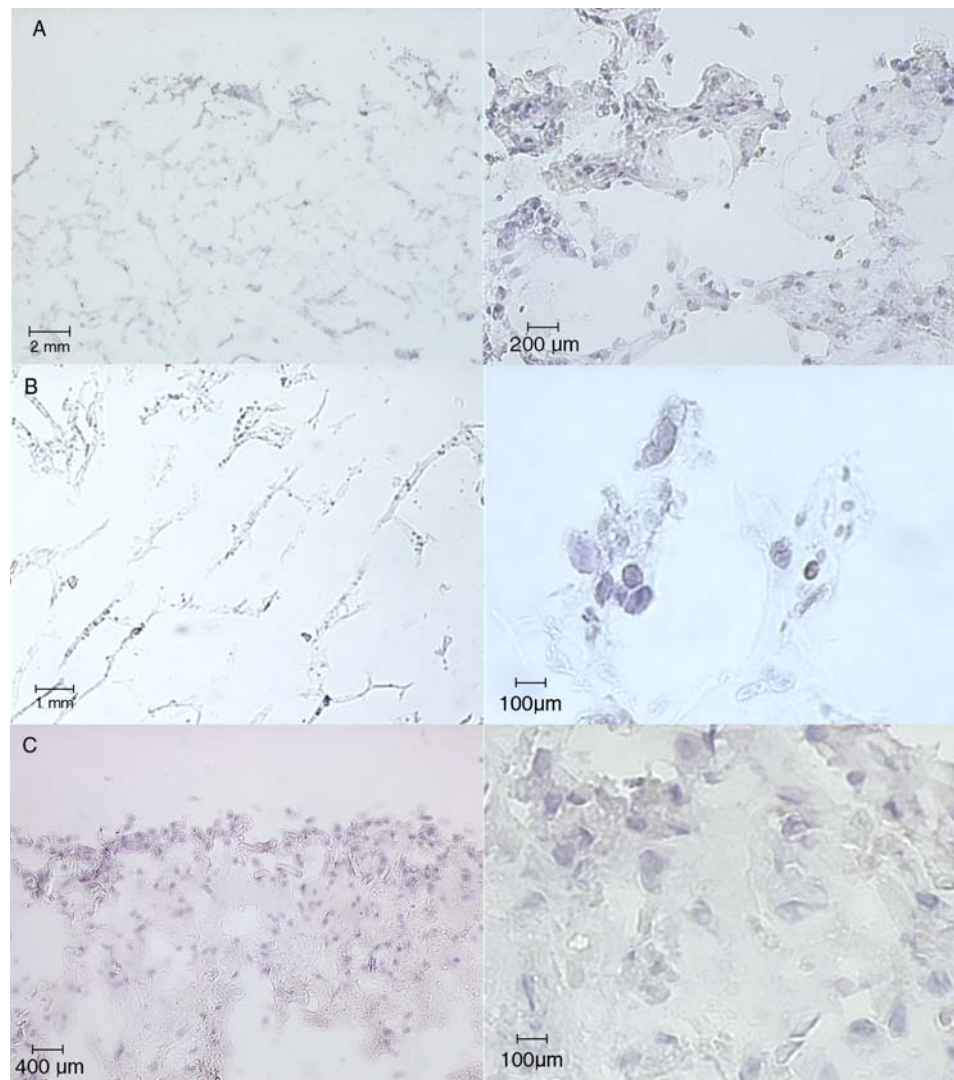


Mit der längeren Kulturzeit änderte sich das morphologische Bild hinsichtlich der Zelldichte und Organisation des Zellverbundes. Nach sechs Wochen produzierten alle belasteten Proben eine Matrix (0,1 Hz Probe fehlend). Diesmal waren die Präparate mit der langsamsten Frequenz (0,01 Hz) der schnellsten Frequenz (0,5 Hz) deutlich überlegen (Abb. 17). Nach zwölf Wochen kam es offensichtlich morphologisch zur Degeneration der Präparate, wobei auch hier die langsamste Frequenz (0,01 Hz) den Zellverbund am besten aufrecht erhielt (Abb. 18).

**Abb. 17** Hämatoxylin-Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies mit Druck 0,5 Hz (A), und 0,01 Hz (B) nach sechs Wochen



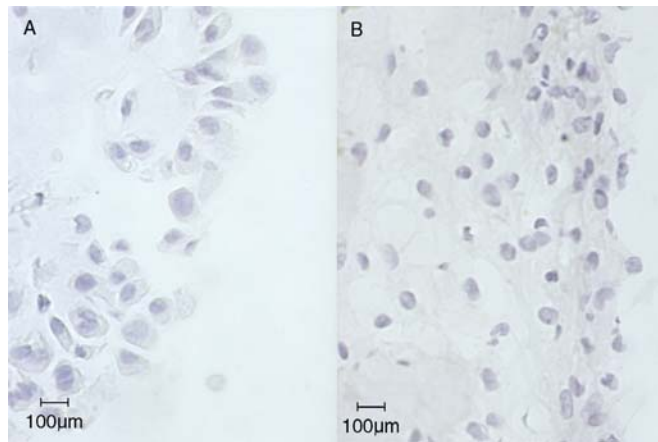
**Abb. 18** Hämatoxylin-Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies mit Druck 0,5 Hz (A), 0,1 Hz (B) und 0,01 Hz (C) nach zwölf Wochen



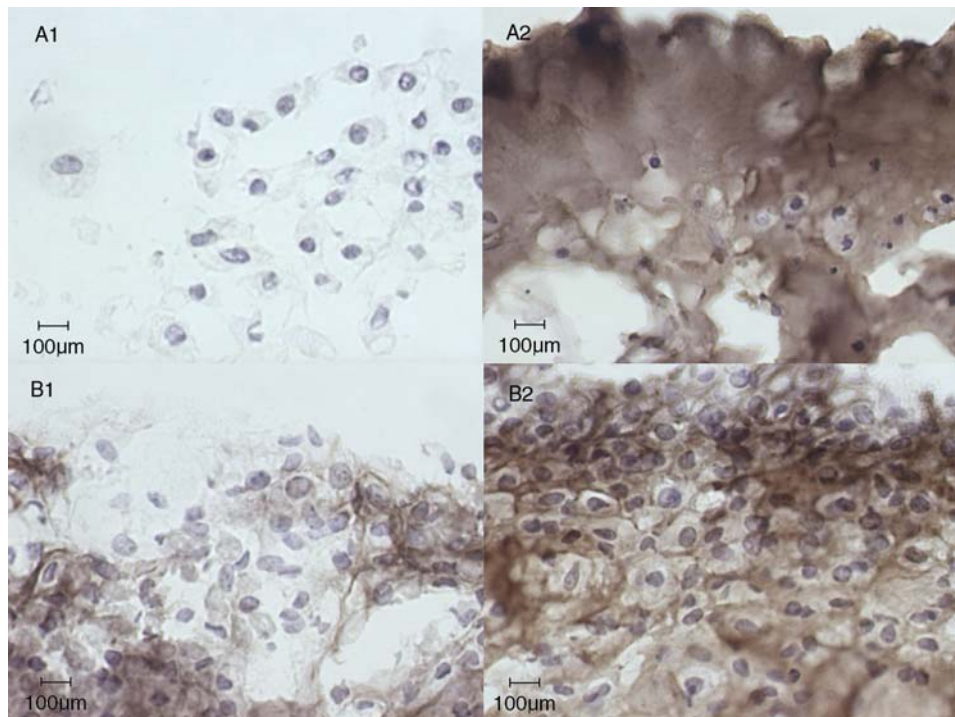
In der Immunhistologie bestätigte sich das morphologische Bild durch Auftreten von Kollagen I. Nach sechs Wochen fand sich bei der schnellsten Frequenz noch keine Markierung, während bei den langsameren Frequenzen schon eine deutliche Zunahme der Kollagen II – Bildung zu sehen war. Es zeigte sich das mit der langsamsten Frequenz (0,01 Hz) belastete Präparat zwar seitens der Beschaffenheit den anderen überlegen, Kollagen I war jedoch schon nach sechs Wochen vorhanden (Abb. 19). Nach zwölf Wochen war in allen Präparaten Kollagen I nachweisbar (Abb. 20).



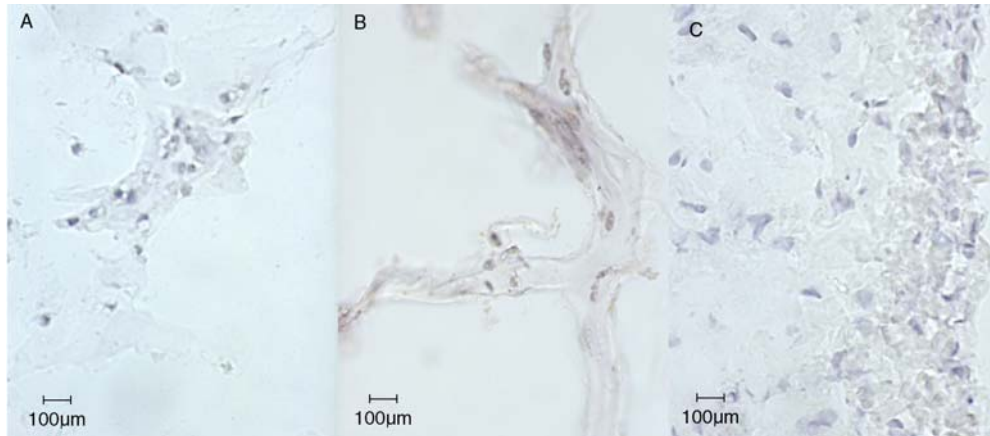
**Abb. 19** Kollagen I (1) und Kollagen II (2) Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies unter 0,5 Hz (A) und 0,01 Hz (B) nach sechs Wochen



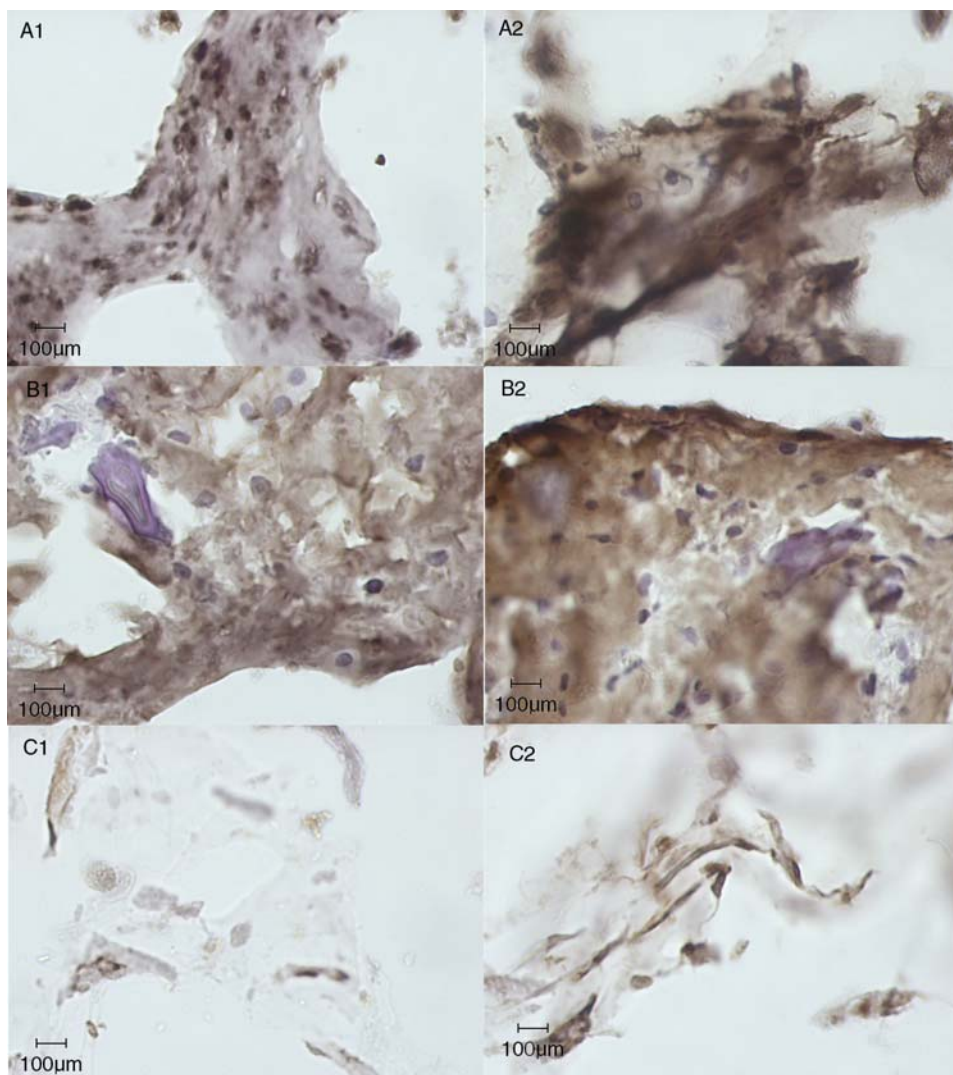
Kontrolle (6 Wochen)



**Abb. 20** Kollagen I (1) und Kollagen II (2) Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies bei 0,5 Hz (A), 0,1 Hz (B) und 0,01 Hz (C) nach zwölf Wochen

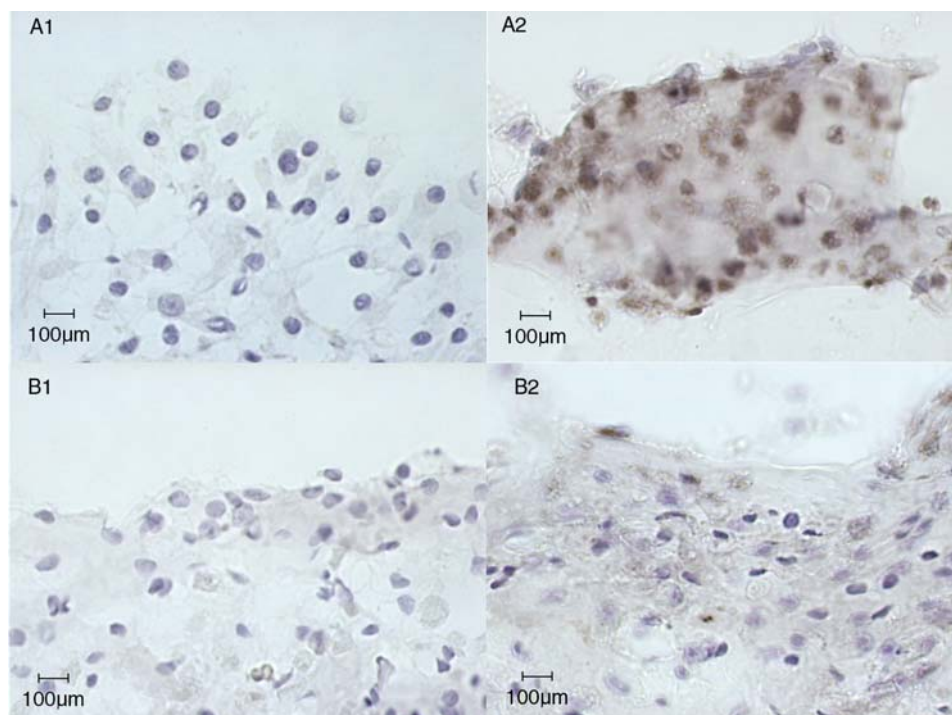


Kontrolle (12 Wochen)



Auch die Bildung von Kollagen III wurde nachgewiesen. Kollagen III wird hauptsächlich von Osteoblasten oder Fibroblasten produziert und ist auch im Faserknorpel enthalten. Es kann als Marker der Degeneration der Knorpelzellen gelten. Nach längerer Kultivationszeit stieg die Produktion von Kollagen III bei der langsamsten Frequenz an. Bei der schnellsten Frequenz zeigte sich Kollagen III ebenso, aber mit geringerer Ausprägung (Abb. 21).

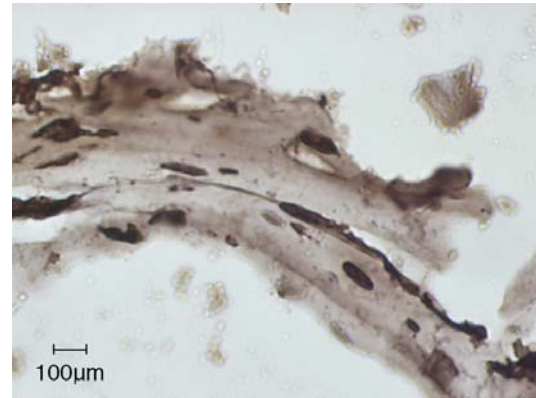
**Abb. 21** Kollagen III Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies unter 0,5 Hz (A), und 0,01 Hz (B) nach sechs (1) und zwölf (2) Wochen



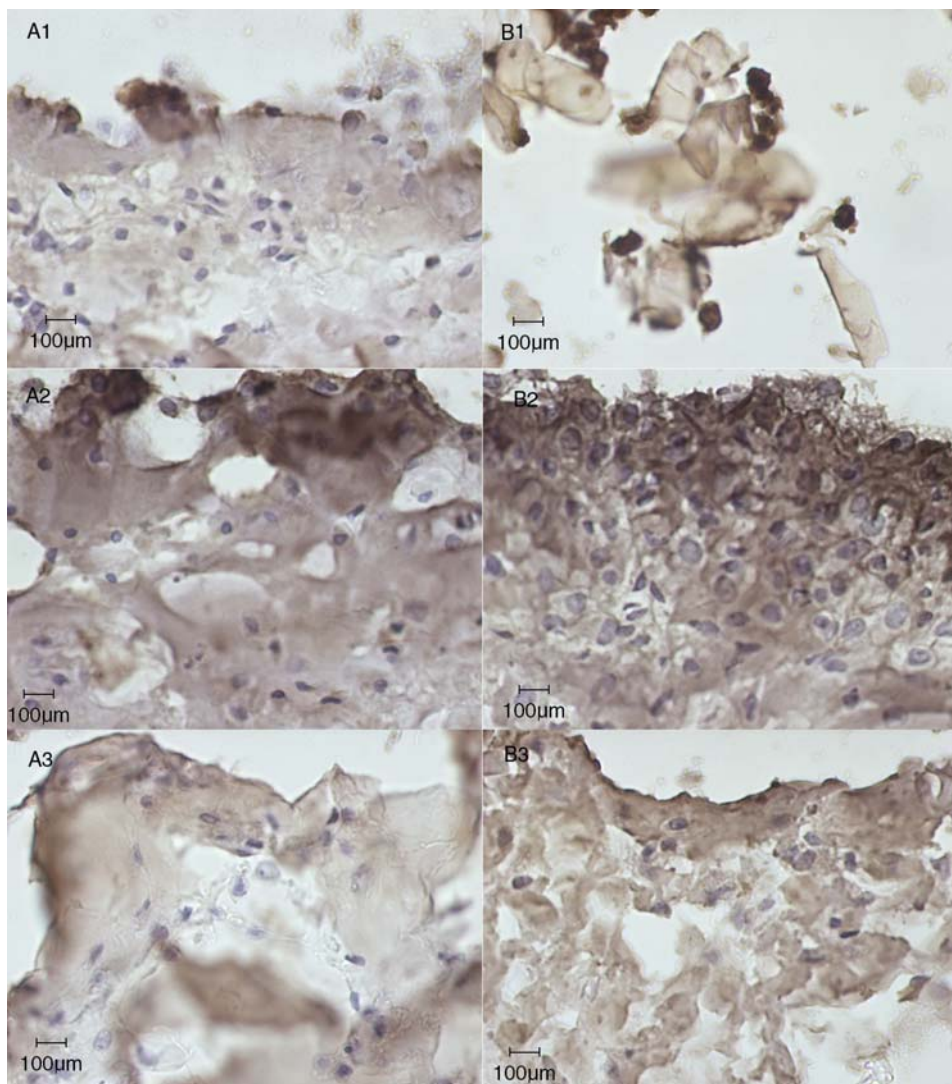
Glykosaminoglykane (Keratansulphat, Chondroitin-4-sulphat + Dermatansulphat und Chondroitin-6-sulphat) waren in allen Präparaten nachweisbar. Eine ausgedehntere Markierung von GAGs fand sich in der Regel bei den zwölf Wochen Präparaten im Vergleich zu sechs und zwei Wochen Präparaten. Es zeigte sich allerdings keine Abhängigkeit von der Druckfrequenz. (Abb. 22-24).



**Abb. 22** Keratansulphat Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies unter 0,5 Hz (A) und 0,01 Hz (B) Druck nach zwei (1), sechs (2) und zwölf (3) Wochen

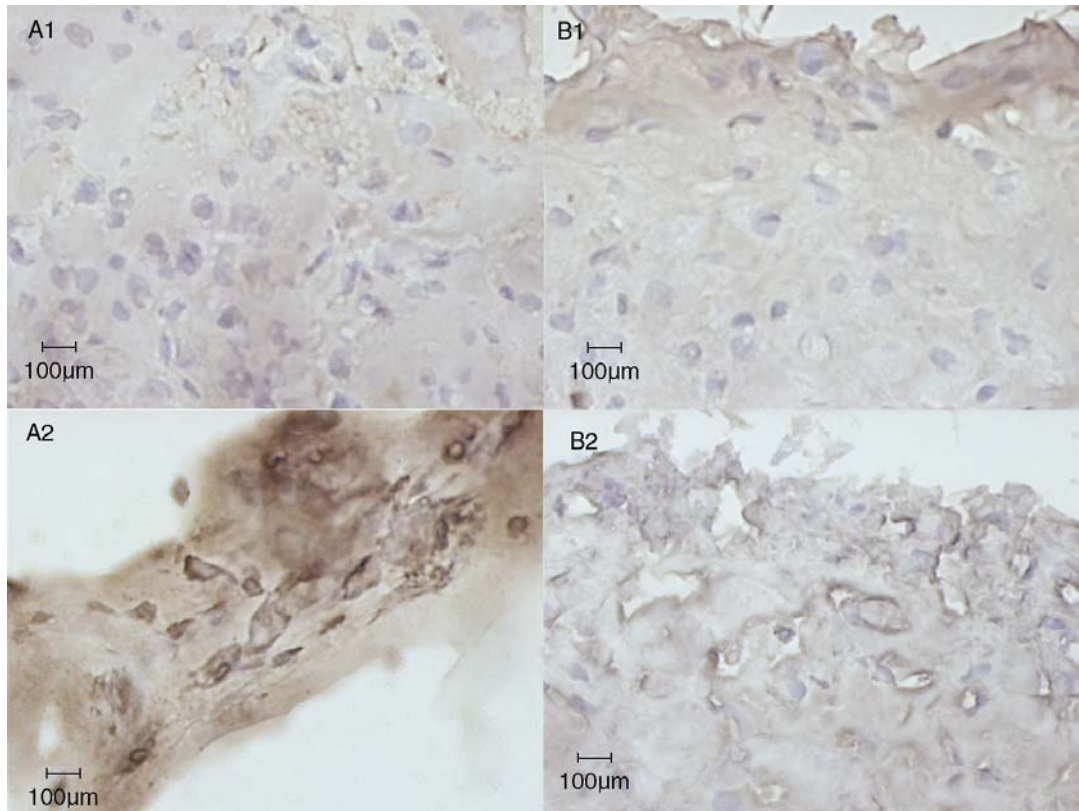


Ohne Druck (12 Wochen)

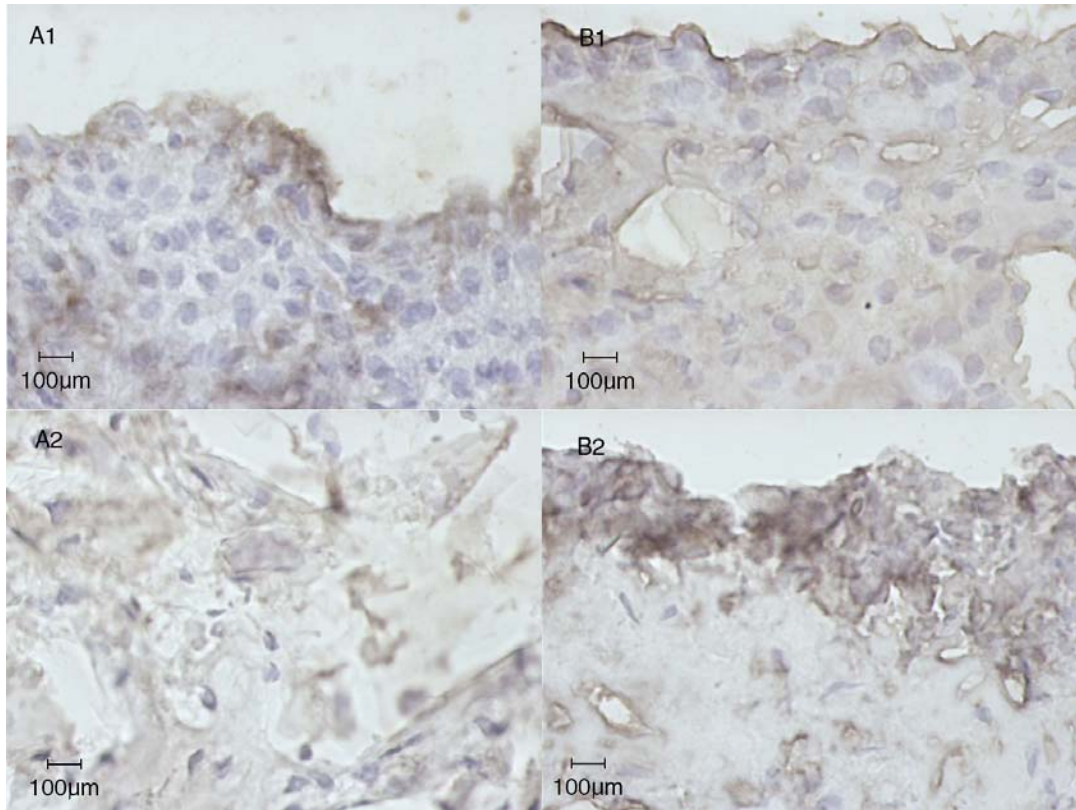




**Abb. 23** Chondroitin-4-sulphat + Dermatansulphat Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies unter 0,5 Hz (A) und 0,01 Hz (B) Druck nach sechs (1) und zwölf (2) Wochen

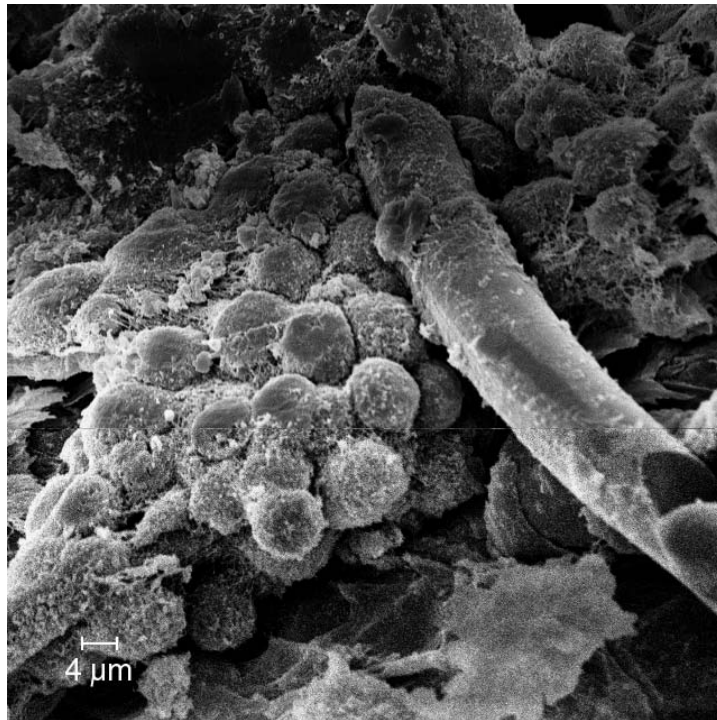


**Abb. 24** Chondroitin-6-sulphat Färbung von Chondrozyten auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies unter 0,5 Hz (A) und 0,01 Hz (B) Druck nach sechs (1) und zwölf (2) Wochen

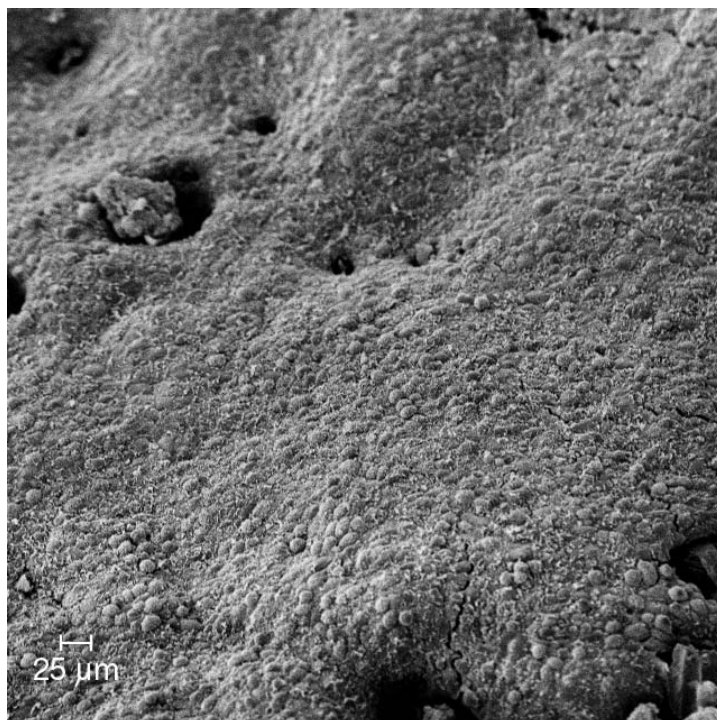


Im Rasterelektronenmikroskop waren nach zwei Wochen die ersten Anhäufungen von Chondrozyten zwischen den noch vorhandenen Vliesfasern zu sehen (Abb. 25). Nach sechs Wochen bildeten die Chondrozyten eine nahezu ebene Oberfläche (Abb. 26) und nach zwölf Wochen waren sie sogar glatt und dicht gepackt (Abb. 27).

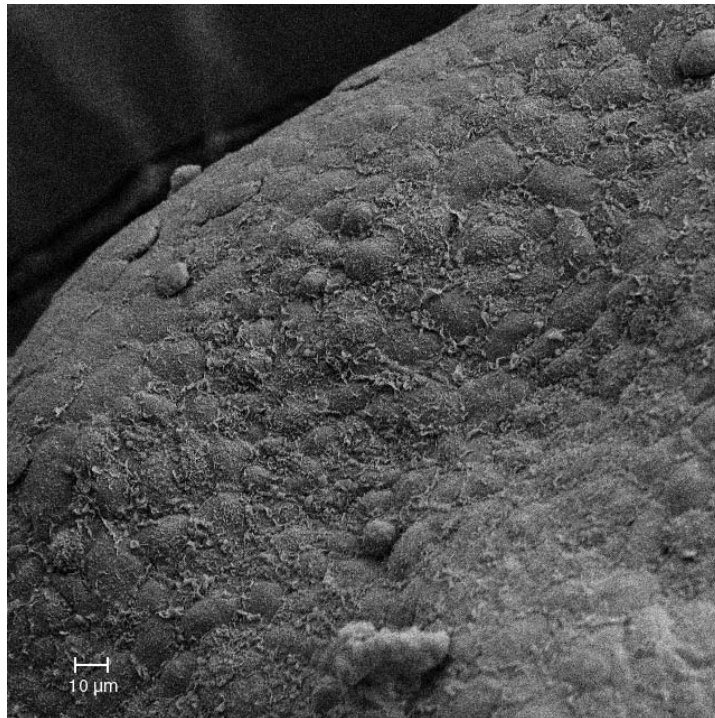
**Abb. 25** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Chondrozytenkultur auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies nach zwei Wochen, mit einer Frequenz von 0,5 Hz belastet



**Abb. 26** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Chondrozytenkultur auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies nach sechs Wochen, mit einer Frequenz von 0,5 Hz belastet



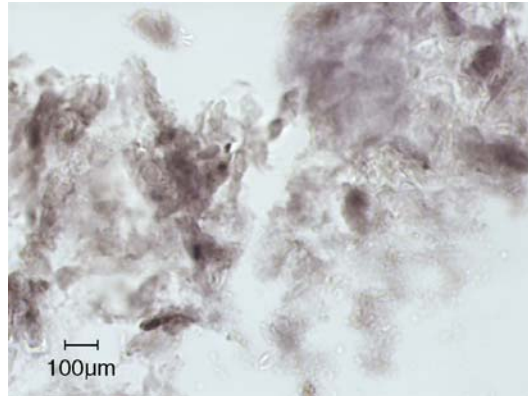
**Abb. 27** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Chondrozytenkultur auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies nach zwölf Wochen, mit einer Frequenz von 0,5 Hz belastet



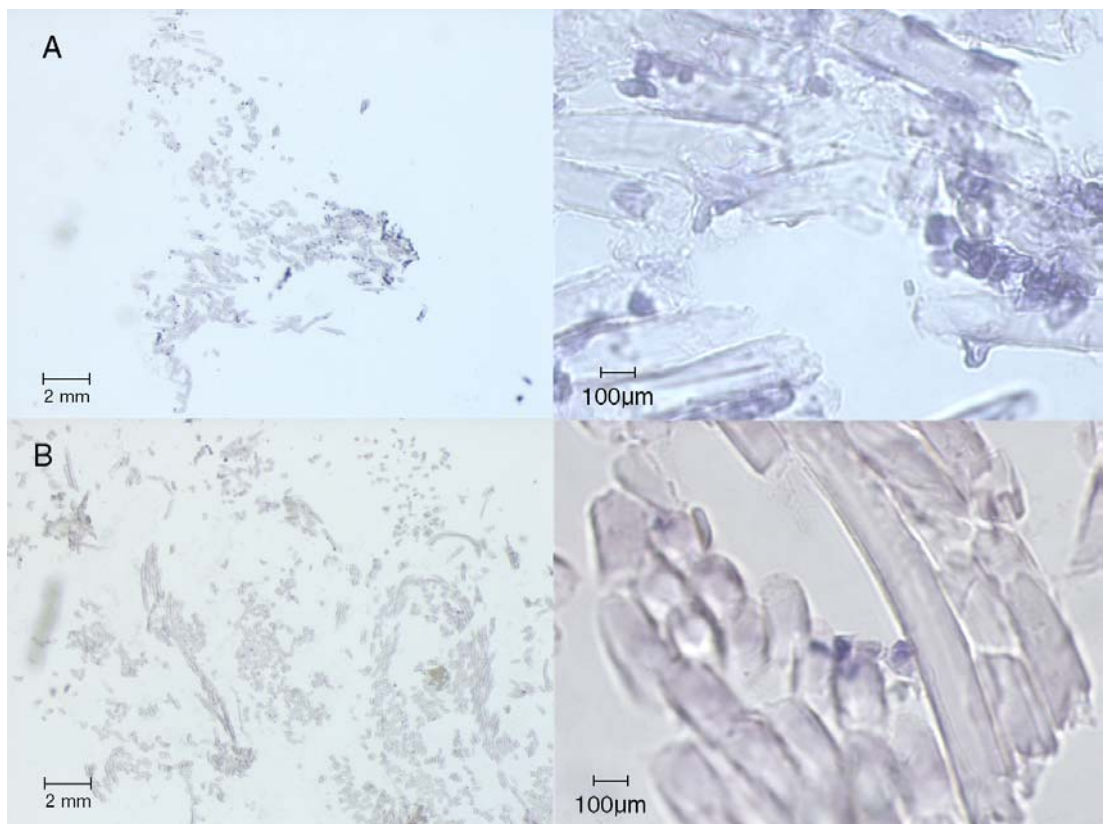
### 3.3.2. Implantation der Chondrozyten nach Monolayerkultur

Es wurden nach drei Wochen  $62,7 \times 10^6$  Zellen aus einer Monolayerkultur entnommen und auf zwölf Vliese in zwei Versuchskammern gesetzt (relative Zelldichte  $34 \times 10^6$  Zellen / ml Vlies). Diese mit Chondrozyten getränkten Vliese wurden mit den Frequenzen 0,5 Hz, 0,01 Hz und ohne Druck für zwei und sechs Wochen kultiviert. Offensichtlich war es bei der Probeentnahme nach zwei Wochen jedoch zur Infektion der Präparate gekommen, sodass nach sechs Wochen nekrotische Zellen eine weitere Aussage nicht zuließen (Abb. 28). Nach zwei Wochen zeigte sich im wesentlichen ein identisches Bild zu den Versuchen mit direkter Implantation der Chondrozyten, mit Bildung von Kollagen I, II und III in der Matrix (Abb. 29 und 30).

**Abb.28** Kollagen II Immunhistologie eines Chondrozytenpräparates nach Monolayerkultur auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies eingebracht, sechs Wochen bei einer Frequenz von 0,5 Hz, nekrotische Zellen

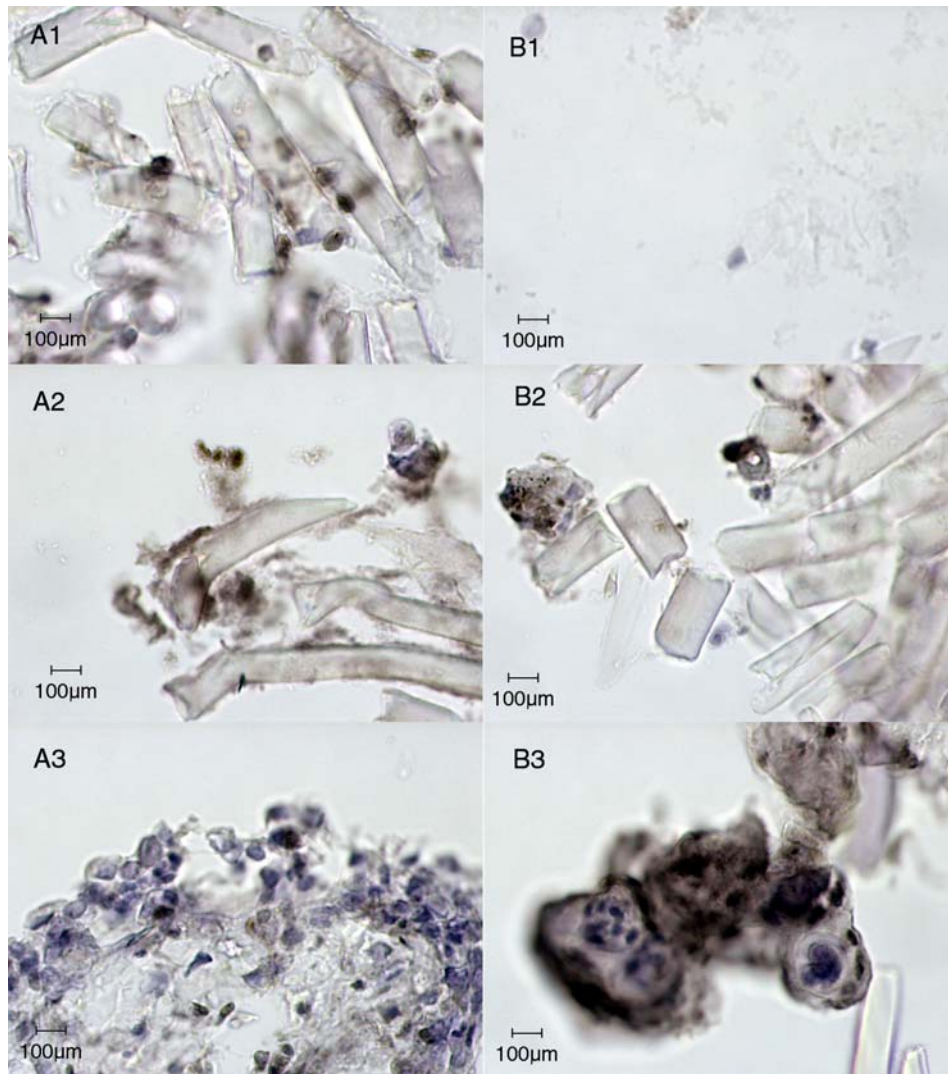


**Abb. 29** Hämatoxylin-Färbung der Chondrozytenpräparate nach Monolayerkultur auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies eingebracht, zwei Wochen bei einer Frequenz von 0,5 Hz (A) und 0,01 Hz (B)





**Abb. 30** Immunhistologie der Chondrozytenpräparate nach Monolayerkultur auf Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies eingebracht, zwei Wochen bei einer Frequenz von 0,5 Hz (A) und 0,01 Hz (B); Kollagen I (1), Kollagen II (2), Kollagen III (3)

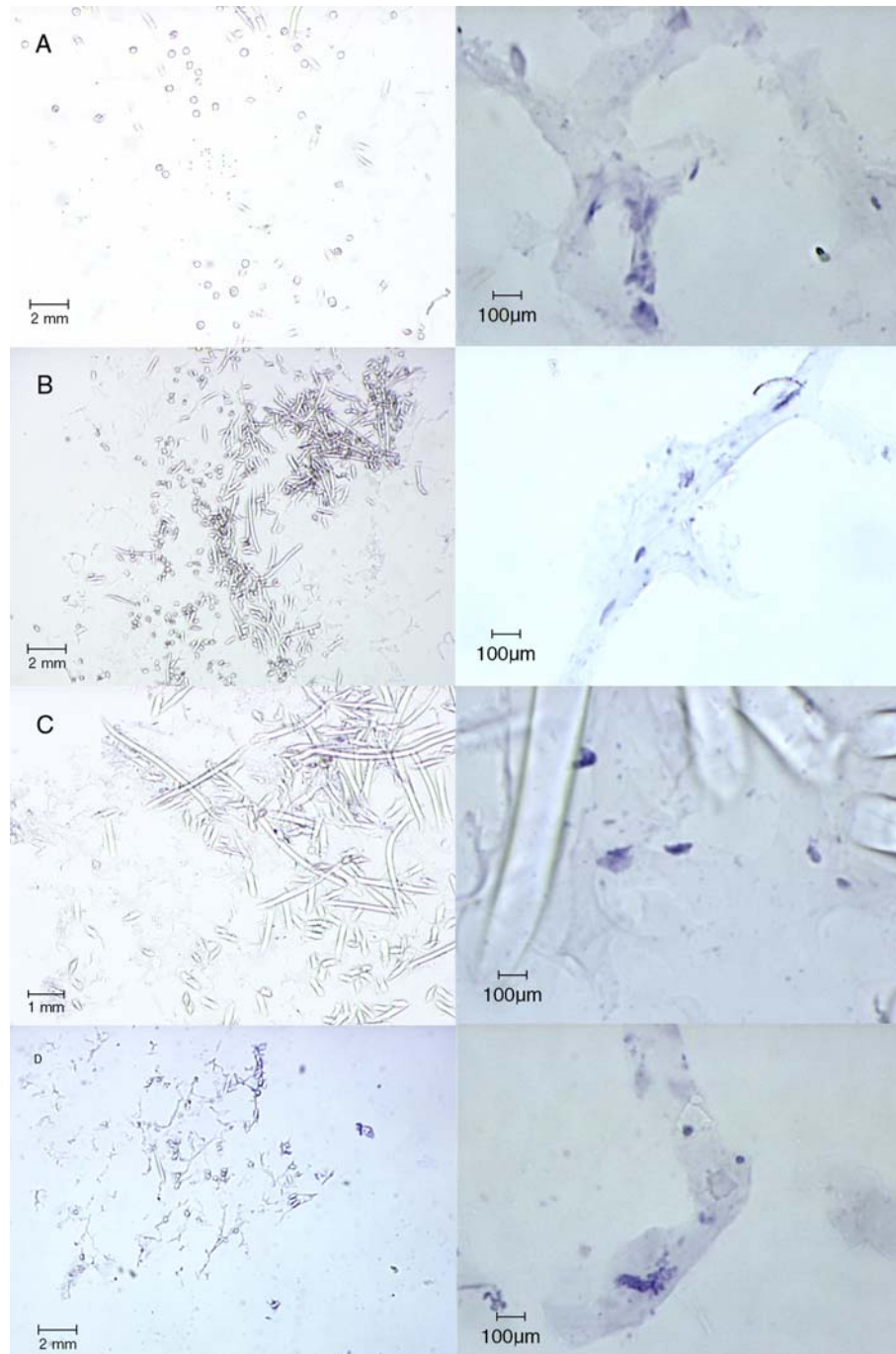


#### **3.4. Ergebnisse mit humanen Knochenmarkstammzellen**

Es konnten Knochenmarkstammzellen von zwei verschiedenen Spendern gewonnen werden und mit einer relativen Zelldichte von ca.  $35 \times 10^6$  Zellen je ml im Vlies in je zwei Versuchskammern eingesetzt werden. Es ist dabei stets zu berücksichtigen, daß es sich hier um ein undifferenziertes Zellgemisch mit nur einem kleinen Teil an mesenchymaler Stammzellen handelt. Je zwei Vliese wurden bei den Frequenzen 0,5 Hz, 0,2 Hz, 0,1 Hz, 0,01 Hz und ohne Druck untersucht. Die Präparate wurden nach jeweils zwei, sechs, neun und zwölf Wochen aus vier Kammern entnommen.

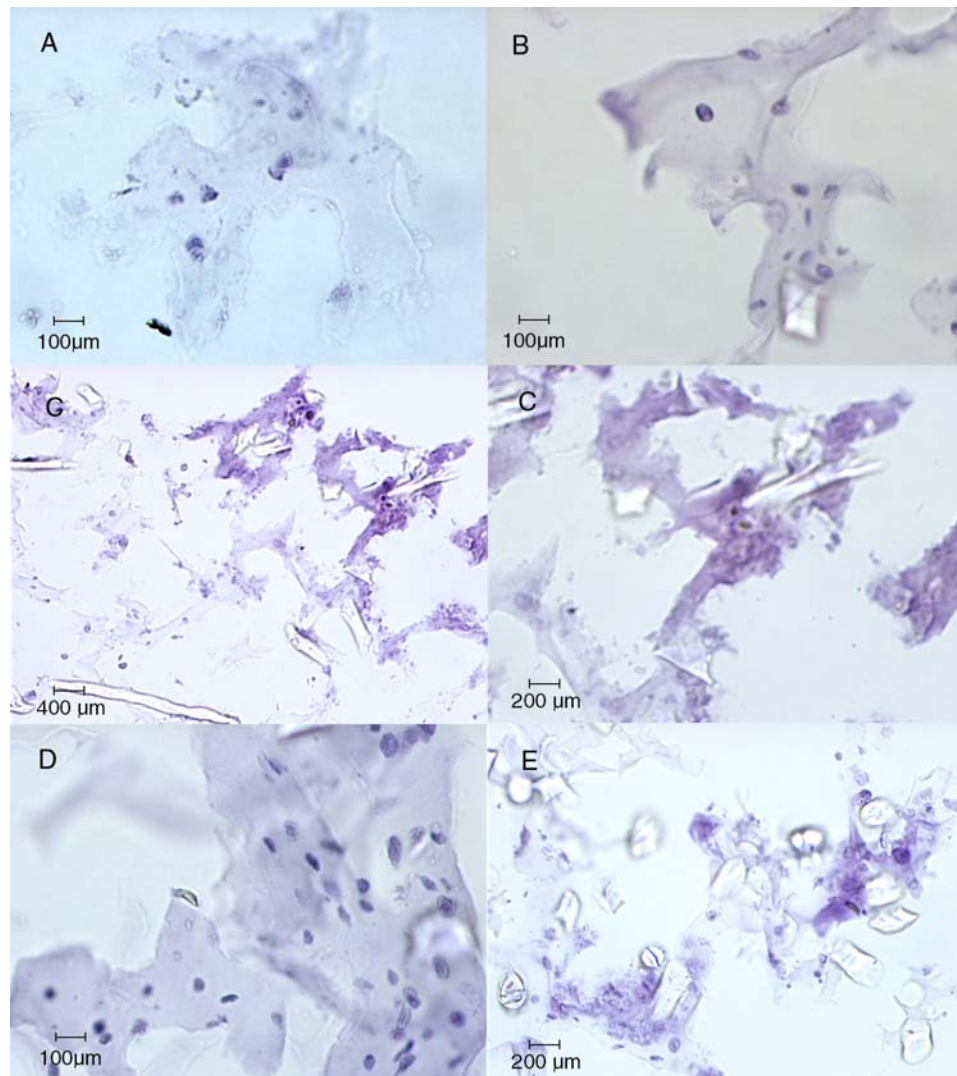
Wie sich bereits schon bei den Präparaten mit direkter Implantation von Chondrozyten gezeigt hatte, war nach zwei Wochen zwar eine Adhärenz der Zellen an die Vliesfasern, jedoch noch keine Matrixbildung erkennbar (Abb. 31).

**Abb. 31** Hämatoxylin-Färbung von Knochenmarkszellen auf Vliesen nach zwei Wochen Kultur mit 0,5 Hz (A), 0,1 Hz (B), 0,01 Hz (C), ohne Druck (D)



Eine partielle Matrixproduktion war erst nach sechs Wochen Kultivierungszeit nachweisbar (Abb. 32).

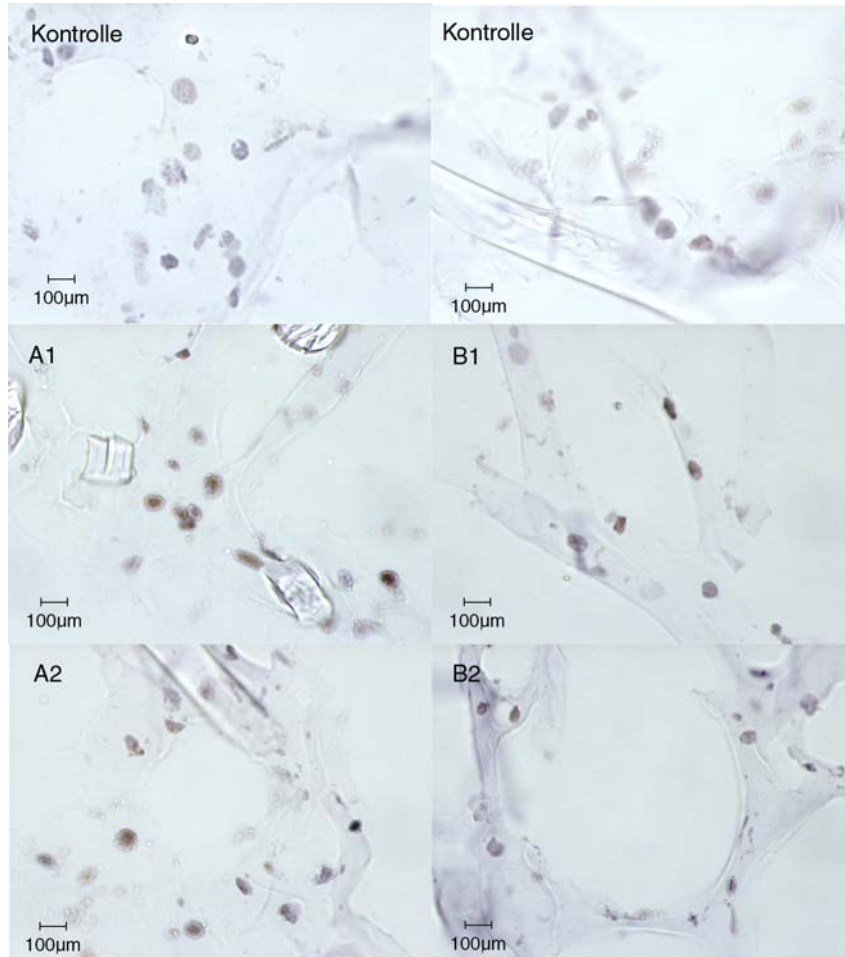
**Abb. 32** Hämatoxylin-Färbung von Knochenmarkstammzellen auf Vliesen nach sechs Wochen Kultur mit 0,5 Hz (A), 0,2 Hz (B), 0,1 Hz (C), 0,01 Hz (D), ohne Druck (E)



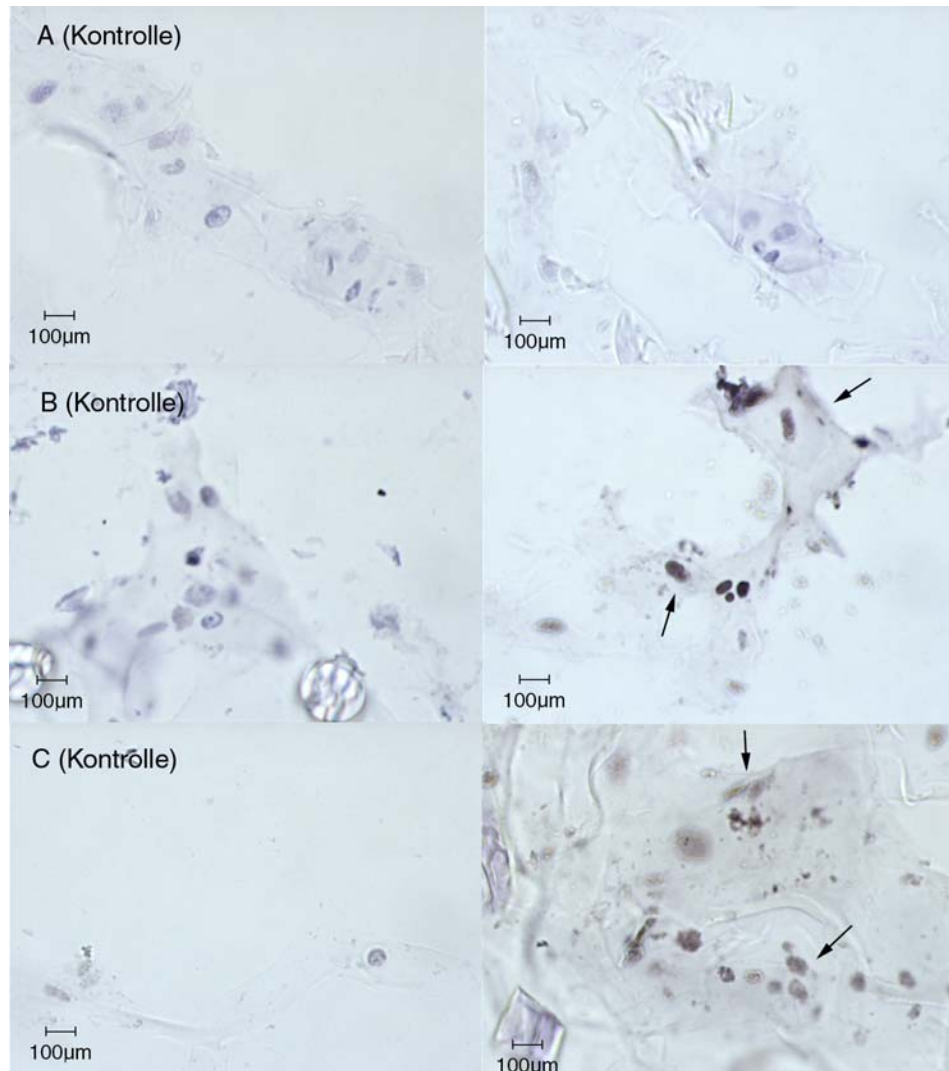
Nach sechs Wochen begann die Produktion von Kollagen I und II bei Präparaten, die mit 0,1 Hz und 0,01 Hz generiert wurden (Abb. 33). In den weiteren Kulturen konnte man keine Matrixbildung nachweisen. Lediglich im mit der schnellsten Frequenz (0,5 Hz) behandelten Präparat war immunhistochemisch nach neun und zwölf Wochen die Bildung von Keratansulphat zu sehen (Abb. 34).



**Abb. 33** Kollagen I (1) und Kollagen II (2) Nachweis in Knochenmarkstammzellen auf Vliesen nach sechs Wochen Kultur mit 0,1 Hz (A) und 0,01 Hz (B)

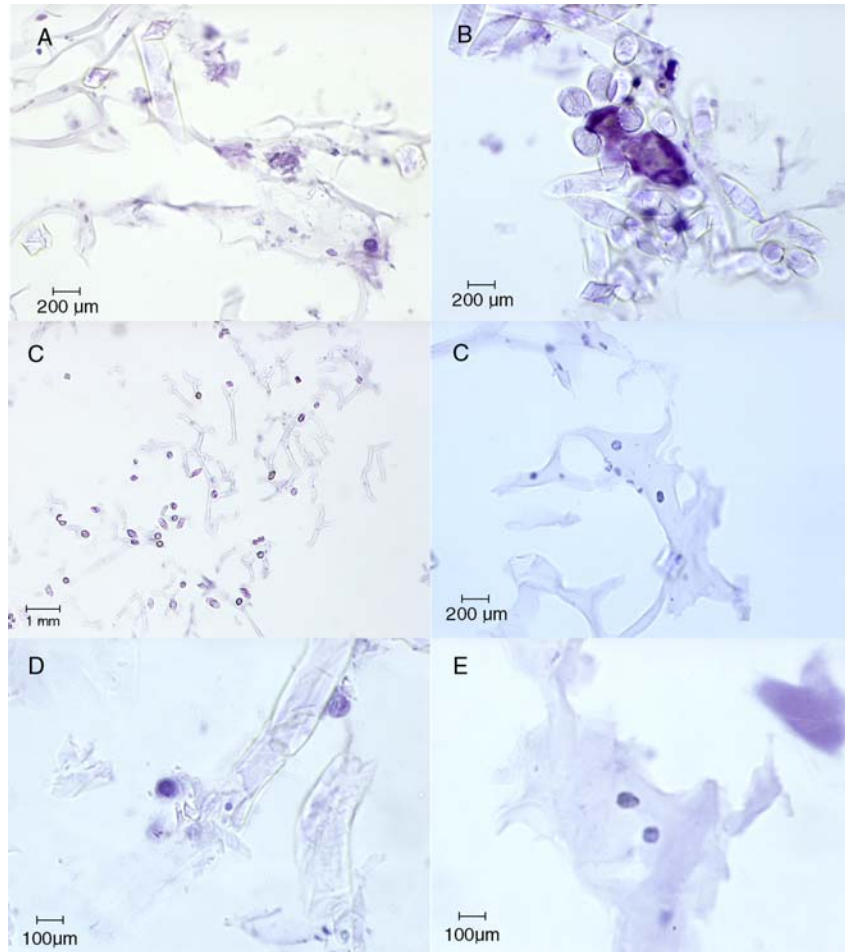


**Abb. 34** Keratansulphatnachweis (Pfeile) in Knochenmarkstammzellen auf Vliesen nach sechs (A), neun (B) und zwölf (C) Wochen bei einer Frequenz von 0,5 Hz

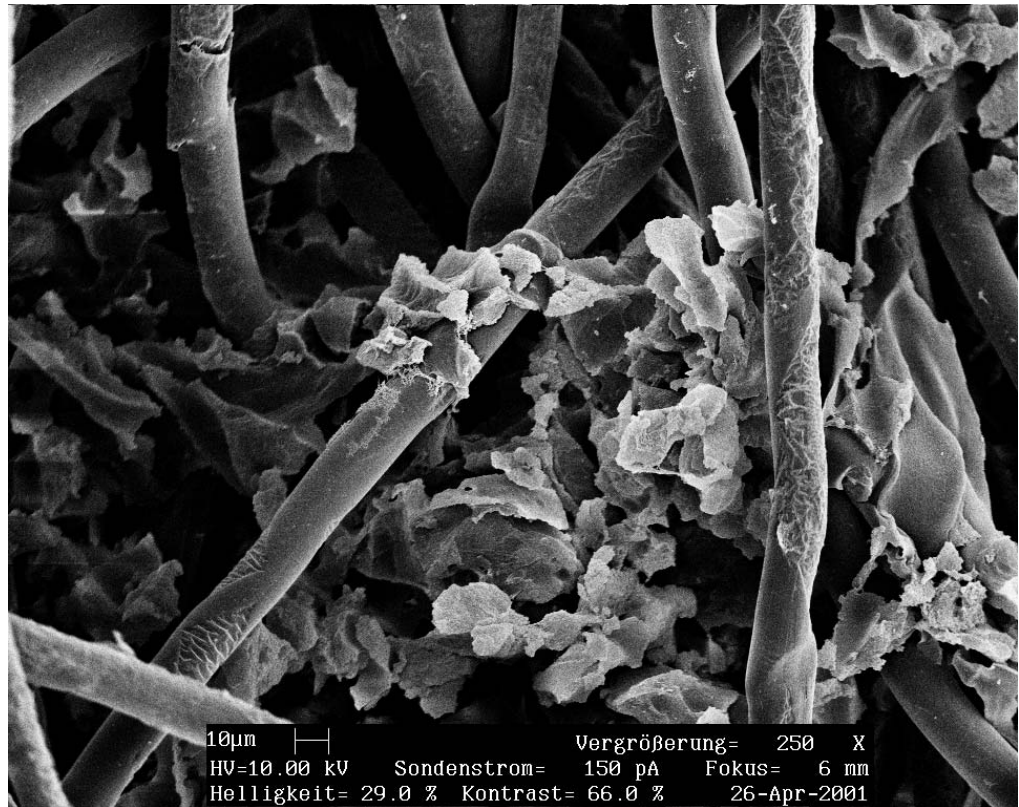


Das gewählte Vlies mit 90 % Laktid-Anteil blieb zu lange stabil und hatte auch nach zwölf Wochen von seiner Integrität nur wenig verloren. Es stand den Zellen wenig Raum zum Aufbau einer Matrixstruktur zur Verfügung und damit war die Matrixproduktion auch nach zwölf Wochen gering ausgeprägt (Abb. 35 und 36).

**Abb. 35** Hämatoxylin-Färbung von Knochenmarkstammzellen auf Vliesen nach zwölf Wochen Kultur mit 0,5 Hz (A), 0,2 Hz (B), 0,1 Hz (C), 0,01 Hz (D), ohne Druck (E)



**Abb. 36** Rasterelektronenmikroskopie eines mit Knochenmarkstammzellen besetzten Vlieses, zwölf Wochen Kultivationszeit, Frequenz 0,2 Hz



## **4. Diskussion**

### **4.1. Zellzahl und Vitalität der Ausgangszellen**

Um den klinischen Einsatz des Systems zur *in vitro* Generierung von Knorpeltransplantaten zu ermöglichen, wurden bewusst primär Chondrozyten als Ausgangszellen verwendet. Generell ist Knorpel zu einem gewissen Teil durch die umgebende Matrix vor immunologischen Reaktionen geschützt (Elves, 1974), doch wiederholte Experimente konnten die hohe Antigenität allogener, xenogener, vitaler und avitaler Knorpeltransplantate nachweisen (Osiecka-Iwan, 1999; Bujia, 1995).

Die Zelldichte ist einer der entscheidendsten Faktoren in der qualitativen und quantitativen Ausbildung der chondrogenen Matrix in der Kultur. Physiologisch liegt die Zelldichte im menschlichen Gelenkknorpel bei ca.  $15 \times 10^6$  Zellen/ml. In einem Experiment untersuchte Puelacher den Einfluss der Chondrozytenkonzentration auf Gewebekonstruktion und Matrixproduktion. Er brachte 2, 10, 20 und  $100 \times 10^6$  Zellen/ml in Vliese ein und implantierte sie nach einer Woche *in vitro* Kultur in athymische Nacktmäuse. Nach zwölf Wochen zeigte sich dabei die Konzentration von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml als histologisch am ehesten natürlichem Knorpel entsprechend (Puelacher, 1994). In einer anderen Arbeit zeigte sich das Optimum im Vergleich zum nativen Knorpel bei  $40 \times 10^6$  Zellen/ml (Panossian, 2001). Hier wurden suspendierte Chondrozyten in Konzentrationen von 10, 20, 40, und  $80 \times 10^6$  Zellen/ml subkutan in athymische Nacktmäuse injiziert.

Die von uns verwendeten Zellkonzentrationen von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml Tutogen<sup>®</sup> Spongiosa,  $40 \times 10^6$  Zellen/ml Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies und  $35 \times 10^6$  Knochenmarkstammzellen/ml Vlies lagen im optimalen Bereich.

### **4.2. Trägersysteme**

Prinzipiell müssen die Resultate der eigenen Arbeit in Bezug auf das zur Einbringung benutzte Gel sowie den verwendeten Trägersystemen diskutiert werden. Im Vergleich der Kultur von bovinen Chondrozyten in Agarose und Alginat-Gelen zeigte sich ein signifikanter Vorteil in der GAG-Produktion am Beispiel des Aggrecans bei den in Agarose kultivierten Zellen (Hauselmann, 1992). Auch bei der Kultur von mesenchymalen Stammzellen in Kollagen Gelen, Alginat und Agarose war

der gleiche Effekt nachweisbar, wobei hier das Kollagen I-Gel am schlechtesten beurteilt wurde (Diduch, 2000). Seitens der möglichen Agarose-Konzentration zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 2 % - 4 % eine ausreichende Immobilisation der PG zum Aufbau einer kollagenen Matrix stattfindet (Verbruggen, 1990). Die von uns gewählte Konzentration von 2 % kann damit als günstig bezeichnet werden.

Initial wurde der Ansatz verfolgt, den Zellen einen stabilen Träger zur Verfügung zu stellen, der den gewünschten hohen Druckfrequenzen auch mechanisch standhalten kann. Wenn man nun die Ergebnisse analysiert, die mit der kommerziell aufbereiteten Spongiosa erzielt wurden, zeigt sich sofort der prinzipielle Fehler im experimentellen Ansatz. Der auf die Probe aufgebrauchte mechanische Stempeldruck konnte aufgrund der hohen Stabilität der Spongiosastruktur zu keinem Zeitpunkt auf die Zellen übertragen werden. Entsprechend kam es auch nicht, wie im Ergebnisteil gezeigt, zu einer ausgeprägten Matrixproduktion. Auch die mit mehreren 100 µm vergleichsweise großen Poren dürften sich negativ ausgewirkt haben. Damit war die Fragestellung des Einflusses von mechanischer Belastung auf die Chondrozyten mit diesem Modell nicht zu beantworten.

Im Unterschied hierzu erlaubte das Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies eine gute Übertragung der mechanischen Belastung im Sinne der Fragestellung. Es zeigte nach Resorption (nach ca. sechs Wochen) keinen negativen Effekt der Degradationsprodukte auf die Zellkultur. Diese Ergebnisse werden von einer Reihe anderer Autoren geteilt, entsprechend häufig finden Polyglykolsäure-Vliese auch Anwendung in vitro, wie auch in vivo Experimenten (Grande, 1997; Freed, 1994). Das von uns beobachtete Degradationsverhalten des Ethisorb<sup>®</sup>-Vlieses entsprach dabei dem auch in vivo zu erwartenden zeitlichen Verlauf (Perka, 2000). Wichtig erscheint hier der Faserabstand im Vlies, der einerseits eine gute Anheftung der Zellen an die Fasern erlauben muß, andererseits aber einer Matrixproduktion nicht im Wege stehen darf. Der bei Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies typischerweise vorhandene Abstand von ca. 40 – 150 µm (Abb. 14) entspricht gut den aus der Literatur bekannten günstigen Werten von 50 – 100 µm (Sittinger, 1996).

Untersucht man die Degradationsprodukte von Laktid- und Polyglykolsäure-Vliesen, zeigen allerdings letztere zumindest in höheren Konzentrationen eine etwas schlechtere Biokompatibilität (Bujia, 1995b).

Da wir zwischen den histologischen Resultaten der sechsten und zwölften Woche bei den mit Chondrozyten besetzten Vliesen eine Verschlechterung im Sinne einer zunehmenden Desintegration des Zellverbundes sowie eine als Dedifferenzierung zu Faserknorpel bzw. faserigem Bindegewebe zu deutende Zunahme der Kollagen I- und Kollagen III-Bildung beobachteten (Abb. 20 und 21), versuchten wir, den Zellen im nachfolgenden Experiment mit humanen Knochenmarkstammzellen eine länger bestehende Stützstruktur durch ein wesentlich langsamer abbaubares Vlies (Polylaktid : Polyglykosid 9:1) zu bieten. Offensichtlich war dies jedoch ein Fehler. Die Vliesstruktur behinderte stark das bis zum Ende der Kulturzeit von zwölf Wochen erwartete Zellwachstum und die Matrixproduktion. Dieser Effekt konnte auch tierexperimentell im direkten Vergleich eines mit Chondrozyten besetzten Ethisorb<sup>®</sup>-Vlieses versus eines reinen Polylaktid-Vlieses nach 24-wöchiger subkutaner Implantation in athymische Nacktmäuse nachgewiesen werden (Rotter, 1998). Da auch nach 24 Wochen eine wesentliche Degradation des Polylaktid-Vlieses nicht eingetreten war, konnte chondrogene Matrix nur spärlich nachgewiesen werden. Zusätzlich fand sich eine bindegewebige Umscheidung des Vlieses mit Einsprossen von Blutgefäßen, das auch als ein Nachteil zu betrachten war.

#### **4.3. Zelldifferenzierung und mechanischer Stimulus**

In Übereinstimmung mit der Literatur sahen wir einen deutlichen Einfluß der mechanischen Stimulation auf die Matrixsyntheseleistung und die kollagene Struktur. Der Nachweis kollagener Matrix schon nach zwei Wochen (Abb. 15 und 16) korreliert dabei gut mit Ergebnissen anderer Autoren. Sie konnten nachweisen, dass ein Anstieg der elastischen Eigenschaften von mechanisch stimulierten Chondrozytentransplantaten (als Ausdruck einer verstärkten Matrixbildung) signifikant ab einem Zeitraum von drei Wochen Kultur (noch nicht signifikant bei zwei Wochen) stattfand (Mauck, 2000).

Von besonderem Interesse waren die festgestellten Unterschiede seitens der verschiedenen Frequenzen. Für die Zelldichte und Matrixproduktion zeigte sich nach zwei Wochen die schnellste Frequenz (0,5 Hz) als ideal (Abb. 15). Nach sechs und zwölf Wochen führte die langsamste Frequenz (0,01 Hz) zur deutlich höheren Zelldichte (Abb. 17 und 18). Die günstigere qualitative Zusammensetzung im Sinne

eines höheren Kollagen II- und niedrigeren Kollagen I- und -III-Gehaltes fand sich jedoch stets bei der schnellsten Frequenz. (Abb. 19 – 21). Auch in der Literatur ist dieses Verhalten bekannt. Im vergleichenden Experiment führte die Suspensionskultur der Zellen im Gegensatz zur alternierenden mechanischen Belastung zur signifikant höheren Zellzahl bei jedoch erheblich niedrigerer Produktion an Matrixsubstanz (Carver, 1999).

Seitens der dabei verwendeten Frequenzen wurde im Kurzzeitversuch über 72 h eine für die Produktion von GAGs optimale Frequenz von 1 Hz versus einer eher inhibitorischen Wirkung von 0,3 Hz und keiner Beeinflussung bei 3 Hz gefunden (Lee, 2000). Dies würde die Ergebnisse der ersten zwei Wochen unseres Ansatzes durchaus bestätigen, da sich die Frequenz von 0,5 Hz versus allen anderen langsameren Frequenzen als ideal erwiesen hatte. Man darf allerdings die Bedeutung der Langzeitkultur nicht aus den Augen verlieren, da es hier zu deutlichen Verschiebungen im Expressionsmuster der Matrix kam.

Erheblich waren die Differenzen zwischen den primär und nach dedifferenzierter Monolayerkultur implantierten Chondrozyten. Nach zwei Wochen war bei der Monolayerkultur im Unterschied zu der primären Implantation eine völlig undifferenzierte, kollagene Matrix nachweisbar (Abb. 30). Offensichtlich war es den Zellen zwar hier möglich, Kollagen zu produzieren, zur Redifferenzierung war der Zeitraum jedoch zu kurz. Leider mußten die 6-Wochen-Präparate aufgrund wahrscheinlicher Infektion verworfen werden.

Weiterhin bleibt allerdings der Einfluß der effektiven Dauer der Stimulation (Stimulationszeit pro Gesamtzeit) unklar. Da in unseren Experimenten die Stimulation kontinuierlich ohne Einschaltung von zusätzlichen längeren Pausen erfolgte, kann hier keine signifikante Aussage getroffen werden.

#### **4.4. Humane Knochenmarkstammzellen in der belasteten Kultur**

Aufgrund der retrospektiv sehr ungünstigen Wahl des 90 % Laktid-Vlieses, ist eine definitive Wertung und Diskussion der Ergebnisse nur sehr eingeschränkt möglich. Interessant war jedoch, dass eine Keratansulphatbildung als Zeichen einer beginnenden chondrogenen Differenzierung lediglich in der Kultur mit schnellster Frequenz (0,5 Hz) und nach zwölf Wochen stattfand (Abb. 34).



Hier bleibt zu berücksichtigen, dass die anfänglich hohe Zellzahl nur einen ausgesprochen geringen Anteil ( $< 0,02\%$ ) an wirklich mesenchymalen Stammzellen enthielt. Damit ist auch die Zelldichte insgesamt deutlich geringer einzuschätzen. Entsprechend benötigen mesenchymale Stammzellen mehr Zeit bis zum Aufbau einer für die chondrogene Differenzierung notwendige Zellkonzentration (Caplan, 1994; Ashton, 1980). Eine Reihe von Arbeiten konnte wesentliche biochemische Faktoren wie TGF- $\beta$  oder Dexamethason als auslösende Faktoren der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen nachweisen (Martin, 2001; Freed, 1998; Johnstone, 1998). Ausschließlich mechanische Faktoren im *in vitro* Experiment (bei allerdings lediglich drei Tagen Kultur) wurden von Elder et al. in seiner Arbeit an mesenchymalen Hühnerzellen untersucht (Elder, 2001). Dabei zeigte sich im Vergleich von verschiedenen Frequenzen axialer Belastung mit 9,25 kPa (0,03, 0,15 und 0,33 Hz) eine beginnende chondrozytäre Differenzierung durch GAG-Syntheseanstieg ab einer Frequenz von 0,15 Hz und stärker noch bei 0,33 Hz. Damit läßt sich auch der von uns beobachtete Einfluß bei der maximalen Frequenz von 0,5 Hz sehr gut korrelieren.

#### **4.5. Problematik der Langzeitkultur**

Die Langzeitzellkultur ist trotz verbesserter Technik immer noch problematisch. Zellen, auch Chondrozyten, reagieren z.B. empfindlich auf Änderungen der Konzentration an gelösten Gasen. Ein Effekt, der in der Langzeitkultur ohne Brutschrankbedingungen durchaus relevant werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass in der 3-D-Alginatkultur von Chondrozyten eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf Raumluftwerte (20 %) zur völligen Aufhebung der Kollagen II-Bildung führt (Domm, 2000). Interessanterweise beobachteten auch wir diesen Effekt als Zufallsbefund. Da in unserem kleinen Versuchsraum kein Preßluftanschluß zur Verfügung stand, erfolgte der Antrieb der Perfusionskammern zeitweise mit O<sub>2</sub>-Gas. Da die Preßluftzylinder der Kammern eine erhebliche Menge an Gas als Ausstoß freisetzen, wurden alle Versuchsaufbauten mit einer hohen Konzentration an Sauerstoff umspült. Es kam dabei nicht nur zum fast völligen Stillstand des Zellwachstums in den Kammern (nicht gezeigt, da nicht kontrolliert verwertbar), sondern auch zur Hemmung des Wachstums sämtlicher im Raum in Brutschränken befindlichen anderen Experimentalkulturen. Erst nach Beendigung

des Sauerstoffzuflusses normalisierten sich die Wachstumsraten aller Kulturen. Generell ideal ist, wie auch in mehreren anderen Arbeiten gezeigt, eine eher niedrigere, aber nicht unter 5 % liegende, Sauerstoffkonzentration sowohl in der Chondrozyten-, wie auch in der mesenchymalen Stammzellkultur (Lennon, 2001; O'Driscoll, 1997).

Eine der typischen Komplikationen der Zellkultur ist die Kontamination mit Mikroorganismen. Durch entsprechende Gestaltung der Versuchskammern und des Versuchsprotokolls (Entnahme aller Proben aus einer Kammer zu einem Zeitpunkt) konnte das Risiko einer bakteriellen Infektion erheblich reduziert werden. Eine Pilzinfektion wurde trotz Verzichtes auf prophylaktische Gabe von Antimykotika nicht beobachtet.

Für die klinische Anwendung in vitro generierter Knorpeltransplantate bleibt die Frage des Serumzusatzes zu den Kulturmedien. Serumfreie Medien zeigen dabei trotz optimaler Nährstoffkonzentration ein erheblich schlechteres Wachstum der Zellen, sodass üblicherweise 10 % fetales Kälberserum zugesetzt wird (Quarto, 1997). Obwohl es zwar im Prinzip möglich ist, zumindest für wenige Wochen serumfrei zu kultivieren (Dumont, 1999), empfiehlt sich zumindest in der Dauerkultur der Serumeinsatz. Für die klinische Anwendung ist fetales Kälberserum aufgrund der möglichen Kontaminationen mit Prionen und anderen Erregern eher ungeeignet, weshalb der Einsatz von humanem Serum (autolog) erprobt wurde (Gruber, 1996). Es zeigte sich in der Chondrozytenkultur ein sehr positiver Effekt im Wachstumsverhalten versus des Einsatzes von Kälberserum, sodass der klinischen Anwendung diesbezüglich keine Nachteile zum in vitro Experiment entstehen.

#### **4.6. Schlußfolgerung**

Aufgrund der am Anfang für diese Arbeit aufgestellten Fragen und der experimentell gewonnenen Ergebnisse dieser Studie können folgende Aussagen gemacht werden:

- Chondrozyten lassen sich auch unter hohen mechanischen Belastungen in vitro über mindestens zwölf Wochen kultivieren. Die Versuchskammer bewies sowohl eine hinreichende Langzeitsterilität im Dauerbetrieb als auch eine weitestgehend automatisierte Kontrolle von Perfusion, Druck und Temperatur. Die Betriebssicherheit war gewährleistet. Eine größere Anzahl von Konstrukten

(24) kann simultan unter flexiblen mechanischen Bedingungen untersucht werden. Ein zumindest teilweiser Ersatz von Tierexperimenten durch in vitro Untersuchungen ist damit möglich. Die Dimension der Kammer gewährleistet auch die Generierung von Transplantaten in klinisch bereits relevanten Größen (10 mm).

- Spongiosa zeigte sich aus prinzipiellen mechanischen Gründen (fehlende axiale Druckübertragung auf eingebrachte Zellen) als Trägermaterial nicht geeignet. Ein resorbierbares Vlies aus einem Copolymer von Polyglaktin 910 (Poly-L-Glykol und Poly-L-Laktid 9:1) sowie Poly-p-Dioxanon, Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies, war zur Chondrozytenkultur bis zum Kulturzeitraum von ca. sechs Wochen gut geeignet, verlor jedoch danach seine stützende Funktion. Ein aus 90 % Laktid und 10 % Polyglykosid bestehendes Vlies ist zur Zellkultur nicht zu empfehlen, da das sehr langsame Degradationsverhalten einen regulären Aufbau des Zellverbundes und der Matrixbildung nicht zuließ. Dagegen erwies sich 2 %-ige Agarose als gelatinöser Träger als sehr geeignet.
- Chondrozyten des juvenilen Schweines zeigten sich sowohl hinsichtlich Zellzahl als auch Vitalität als ideales Ausgangsmaterial für in vitro Experimente. Die Entnahme und Aufbereitung humaner Knochenmarkstammzellen ist gut möglich und seitens Vitalität problemlos. Bezüglich der Gesamtzellzahl bleibt dabei allerdings das Problem, daß die tatsächlichen mesenchymalen Stammzellen nur einen geringen Anteil am Gesamtzellvolumen darstellen. In späteren Versuchen wurde deshalb eine Zwischenkultivierung vorgenommen und nur die adhärensten mesenchymalen Zellen für die weiteren Experimente eingesetzt (nach Amplifikation über 2 – 3 Separationen).
- In der Kultur von Chondrozyten unter mechanischer Belastung kam es bis zur zweiten Woche zur Ausbildung einer chondrogenen Matrix. Die Zelldichte der Präparate war dabei nach sechs Wochen bereits maximal, die weitere Kultur erhöhte die Zelldichte nicht. Die kollagene Differenzierung zeigte sich nach sechs Wochen hinsichtlich einer hohen Kollagen II- zu Kollagen I-Verteilung am günstigsten. Im weiteren zeitlichen Verlauf bis zur zwölften Woche wurde dieses Verhältnis zunehmend schlechter, verstärkt konnte auch Kollagen III nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe (ohne Belastung) tritt eine kollagene Matrixbildung nicht vor der zweiten Woche auf. Auch im späteren

Verlauf war diese bei deutlichem Nachweis von Kollagen I, II und III eher ungünstig differenziert. Die beste kollagene Differenzierung erwies sich bei höchster Frequenz (0,5 Hz), z. T. höhere Zelldichte wurde allerdings mit niedrigeren Frequenzen (0,1 und 0,01 Hz) erzielt.

- In der Monolayerkultur dedifferenzierte Chondrozyten bildeten nach zwei Wochen Kultur erste kollagene Matrixbestandteile mit Kollagen I, II und III in jedoch eher ungünstiger Differenzierung.
- Humane Knochenmarkstammzellen zeigten nach zwölf Wochen Kultur unter den ungünstigen Bedingungen eines sehr unzureichend degradierenden Vlieses lediglich bei höchster Frequenz (0,5 Hz) erste Anzeichen einer kollagenen Matrixbildung durch Nachweis von Keratansulphat.

## 5. Zusammenfassung

Die Verwendung von Gewebetransplantaten in der Orthopädie ist heute bereits eine etablierte Technik. Knöcherne Defekte werden mit autologen und allogenen Knochentransplantaten erfolgreich rekonstruiert. Genauso können Sehnen- und Knorpeltransplantate, insbesondere des Kreuzbandapparates am Kniegelenk, dauerhaft eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang entwickelte sich dann auch der Gedanke, Knorpeldefekte des Gelenkes durch Gewebetransplantate zu rekonstruieren.

Wie wir jedoch bereits laut Hunters Aussage von 1743 wissen, ist eine natürliche Regeneration von Knorpel nur sehr eingeschränkt möglich. Der sich in vivo bildende Ersatzknorpel (Faserknorpel), der bei unterschiedlichen Erkrankungen oder Verletzungen entsteht, hat nicht die biomechanischen Eigenschaften von hyalinem Knorpel. Diese minderwertige Qualität des Ersatzknorpels führte zu den Versuchen Gelenkknorpel in vitro zu kultivieren. Die Transplantation der in vitro kultivierten autologen Chondrozyten als Suspension unter operativ gedeckten Defekten zeigte erste ermutigende Ergebnisse.

Aktuell sind folgende Techniken in der Entwicklung:

- die alleinige Transplantation von Knorpelzellen mit oder ohne Träger
- die Transplantation von Vorläuferzellen aus Periost, Perichondrium oder Knochenmarkstammzellen mit oder ohne Träger
- die Implantation von zellfreien Transplantaten als Platzhalter bis zum Einwachsen des Gewebes
- die Transplantation genetisch modifizierter Zellen mit Exprimierung spezifischer Produkte zur Beschleunigung der Defektreparatur

Der typische strukturelle Aufbau des transplantierten Neoknorpels ist neben der histologischen und biochemischen Zusammensetzung entscheidend für die langfristige Stabilität. Ziel der Untersuchungen war es deshalb, den Einfluss mechanischer Faktoren wie den alternierenden mechanischen Druck auf Chondrozyten in der Phase des Wachstums und der Organisation zu einem transplantierbaren Implantat in einer Langzeitperfusionskultur zu evaluieren. Um zu verhindern, dass nicht gewünschte Einflüsse die experimentelle Versuchsreihe verfälschen, wurde insbesondere auf bekannte Wachstums- und Differenzierungs-

faktoren verzichtet. Als Ausgangskultur wurden Chondrozyten und humane Knochenmarkstammzellen eingesetzt.

Die Versuchsreihe bestand darin, insgesamt 24 Konstrukte bei 37° C über mind. zwölf Wochen mit einem Druck von 0,5 MPa bei einer Frequenz von 0,5 Hz, 0,1 Hz, 0,01 Hz und ohne Druck zu belasten. Verwendet wurden in mehreren Versuchsserien Chondrozyten von Schlachtschweinen und humane Knochenmarkstammzellen, die aus dem Beckenkamm von Patienten bei Spongiosaentnahme zur Transplantation aspiriert werden konnten. Die Zellen wurden in Agarosegel in kommerzielle Spongiosazylinder und resorbierbare Vliese mit zwei unterschiedlichen Polymerzusammensetzungen (Copolymer von Polyglaktin 910 (Poly-L-Glykol und Poly-L-Laktid 9:1) sowie Poly-p-Dioxanon, Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies; 90 % Laktid und 10 % Polyglykosid-Vlies) eingebracht und in mit 10 % fetalem Kälberserum versetztem Medium über zwei, sechs und zwölf Wochen kultiviert. Zur Analyse der Ergebnisse erfolgte eine histologische und immunhistologische Aufarbeitung, sowie die Rasterelektronenmikroskopie der entwickelten Präparate.

Es kam zu folgenden Resultaten:

1. Die Eigenschaften der Versuchskammer erfüllten die Anforderungen unserer Testserie. Danach lassen sich Chondrozyten auch unter hohen mechanischen Belastungen in vitro in der Kammer über mindestens zwölf Wochen kultivieren. Chondrozyten des juvenilen Schweines zeigten sich sowohl hinsichtlich Zellzahl als auch Vitalität als ideales Ausgangsmaterial für in vitro Experimente.
2. Ethisorb<sup>®</sup>-Vlies war zur Chondrozytenkultur gut geeignet, verlor aber bereits nach weniger als sechs Wochen seine stützende Funktion. Ein aus 90 % Laktid und 10% Polyglykosid bestehendes Vlies erwies sich als ungeeignet, da die zu lange Degradationszeit das Zellwachstum verhinderte. Die untersuchten Spongiosazylinder erlaubten keine Kraftübertragung auf die Zellen und waren deshalb ein ungeeignetes Trägersystem.
3. Ergebnisse in der Kultur von Chondrozyten unter mechanischer Belastung nach
  - zwei Wochen: Die immunhistologische Auswertung zeigte eine deutliche Kollagen II-Bildung bei kaum Kollagen I-Produktion. Damit war das Verhältnis zwischen Kollagen II zu Kollagen I sehr günstig.

- sechs Wochen: Die Zelldichte der Präparate war zu diesem Zeitpunkt bereits maximal. Sie erhöhte sich im weiteren Verlauf der Versuchsreihe nicht mehr. Die hohe Kollagen II zu Kollagen I-Verteilung zeigte nach sechs Wochen das beste Ergebnis.
- zwölf Wochen: Der Nachweis der kollagenen Differenzierung (Kollagen II zu Kollagen I-Verhältnis), die mit der Immunhistochemie durchgeführt wurde, war jetzt deutlich schlechter. Kollagen III konnte auch verstärkt nachgewiesen werden.

Ergebnisse in der Kultur von Chondrozyten ohne Belastung nach

- zwei Wochen: Eine kollagene Matrixbildung war nicht nachweisbar.
- sechs Wochen: Es wurde Kollagen I, II und III zwar gebildet, aber eher in einer ungünstigen Verteilung.
- zwölf Wochen: Es entstand ein deutlicher Zellverbund, der jedoch keine Differenzierung zu Chondrozyten aufwies.

Ergebnisse von dedifferenzierten Chondrozyten in der Monolayerkultur nach

- zwei Wochen: In der Monolayerkultur dedifferenzierte Chondrozyten bildeten erste kollagene Matrixbestandteile mit Kollagen I, II und III im Sinne einer unzureichenden chondrogenen Differenzierung.
- sechs Wochen: Es kam bei der Probeentnahme nach 2 Wochen zur Infektion, sodass die konsekutiv nekrotischen Zellen eine Aussage nicht zuließen.

4. Bei höchster Frequenz (0,5 Hz) wurde die beste Kollagen II zu Kollagen I-Verteilung nachgewiesen. Dabei zeigte sich auch eine bessere Zellmorphologie der Chondrozyten als bei der langsamsten Frequenz (0,01 Hz). Eine höhere Zelldichte wurde allerdings mit niedrigeren Frequenzen (0,1 und 0,01 Hz) erzielt.
5. Die Entnahme und Aufbereitung humaner Knochenmarkstammzellen war gut möglich und seitens Vitalität geeignet. Humane Stammzellen zeigten nach zwölf Wochen Kultur unter den ungünstigen Bedingungen eines sehr unzureichend degradierenden Vlieses lediglich bei höchster Frequenz (0,5 Hz) erste Anzeichen einer kollagenen Matrixbildung durch Nachweis von Keratansulphat.

Aus den experimentell ermittelten Ergebnissen lässt sich ein klinischer Einsatz der Konstrukte noch nicht rechtfertigen, da sowohl der kollagene Aufbau der generierten Konstrukte, wie auch vor allem die kontinuierliche Stabilität im gesamten Kulturverlauf noch unzureichend ist. Ursächlich dafür dürfte in erster Linie das für das *in vitro* Experiment zu schnelle Degradationsverhalten des Ethisorb<sup>®</sup>-Vlieses sein. Damit kam es in einem kritischen Moment der Gewebebildung nach ca. sechs Wochen zu einem Verlust der mechanischen Stabilität und Integrität der Konstrukte, ohne dass sich bis zu diesem Zeitpunkt eine mechanisch tragfähige, biologische Struktur aufbauen konnte.

Für die nachfolgenden z.B. in der Arthroseforschung notwendigen Versuche sollte man ein Vlies verwenden, das den Zellen nach der ca. sechsten Woche bis zu einem Zeitpunkt (zehnte bis zwölfte Woche), bis die Zellen einen eigenständigen Verbund gebildet haben, eine ausreichende Stabilität bietet. Dieses Vlies darf allerdings nicht, wie leider in dieser Versuchsreihe, das Wachstum und die kollagene Matrixbildung behindern. Eine mechanische Belastung der Zellen mit einer schnellen Frequenz (0,5 Hz) trägt sicherlich zu einer Kollagen II-Produktion und damit zu einer Ausbildung von einer knorpelähnlichen Substanz bei und erwies sich deshalb als sehr günstig. Als experimentelles Modell ist das entwickelte Verfahren ausgezeichnet nutzbar und könnte eventuell sogar eine Reihe von tierexperimentellen Versuchen entbehrlich machen und die Interpretation dieser Versuche erleichtern.



## 6. Literatur

**Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M.** Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 1980; 294-307.

**Bader DL, Kempson GE.** The short-term compressive properties of adult human articular cartilage. *Biomed Mater Eng* 1994; 4:245-256.

**Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L.** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331:889-895.

**Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R.** Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 1996; 45:387-399.

**Bujia J, Osete JM, Sprekelsen C, Wilmes E, Hammer C.** Laryngeal reconstruction using allogeneic cartilages. *Laryngoscope* 1995; 105:644-648.

**Bujia J, Reitzel, Sittinger M.** In-vitro-Züchtung von Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Einfluss von L(+)-Laktat und Glykolat auf kultivierte humane Chondrozyten. *Laryngorhinootologie* 1995b; 74:183-187.

**Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB.** Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci* 1995; 108 ( Pt 4):1497-1508.

**Caplan AI.** The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21:429-435.

**Carver SE, Heath CA.** Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. *Biotechnol Bioeng* 1999; 62:166-174.

**Carver SE, Heath CA.** Influence of intermittent pressure, fluid flow, and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes. *Biotechnol Bioeng* 1999; 65:274-281.

**Carver SE, Heath CA.** Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage. *Tissue Eng* 1999; 5:1-11.

**Chen AC, Sah RL.** Effect of static compression on proteoglycan biosynthesis by chondrocytes transplanted to articular cartilage in vitro. *J Orthop Res* 1998; 16:542-550.

**De Witt MT, Handley CJ, Oakes BW, Lowther DA.** In vitro response of chondrocytes to mechanical loading. The effect of short term mechanical tension. *Connect Tissue Res* 1984; 12:97-109.

**Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G.** Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000; 16:571-577.

**Domm C, Fay J, Schunke M, Kurz B.** Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur. Einfluss von intermittierendem hydrostatischen Druck und niedrigem Sauerstoffpartialdruck. *Orthopäde* 2000; 29:91-99.

**Dumont J, Ionescu M, Reiner A, Poole AR, Tran-Khanh N, Hoemann CD, McKee MD, Buschmann MD.** Mature full-thickness articular cartilage explants

attached to bone are physiologically stable over long-term culture in serum-free media. *Connect Tissue Res* 1999; 40:259-272.

**Elder SH, Goldstein SA, Kimura JH, Soslowsky LJ, Spengler DM.** Chondrocyte differentiation is modulated by frequency and duration of cyclic compressive loading. *Ann Biomed Eng* 2001; 29:476-482.

**Elves MW.** A study of the transplantation antigens on chondrocytes from articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1974; 56:178-185.

**Frank EH, Jin M, Loening AM, Levenston ME, Grodzinsky AJ.** A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J Biomech* 2000; 33:1523-1527.

**Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R.** Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1994; 28:891-899.

**Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G.** Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 1998; 240:58-65.

**Freed LE, Vunjak-Novakovic G.** Microgravity tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33:381-385.

**Giori NJ, Ryd L, Carter DR.** Mechanical influences on tissue differentiation at bone-cement interfaces. *J Arthroplasty* 1995; 10:514-522.

**Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE.** Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop* 1999; S176-S185

**Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R.** Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 1997; 34:211-220.

**Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC.** Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* 1988; 6:777-792.

**Gruber R, Sittinger M, Bujia J.** Untersuchungen zur In-vitro-Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von autologem Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung des möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen-Erkrankungen. *Laryngorhinootologie* 1996; 75:105-108.

**Guldberg RE, Caldwell NJ, Guo XE, Goulet RW, Hollister SJ, Goldstein SA.** Mechanical stimulation of tissue repair in the hydraulic bone chamber. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1295-1302.

**Hall BK.** In vitro studies on the mechanical evocation of advenitious cartilage in the chick. *J Exp Zool* 1968; 168:283-305.

**Ham AW.** A histological study of the early phases of bone repair. *J Bone Joint Surg Am* 12, 827-844. 1930.

**Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ.** Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* 1992; 12:116-129.

**Hillenbrand A.** Entwicklung einer Zellperfusionskammer zur Generierung von Knorpelzelltransplantaten unter mechanischer Belastung. 2001. Doktorarbeit der LMU München, Fachbereich 07, Humanmedizin.

**Holtzer H, Abbott J, Lash J, and Holtzer A.** The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro I. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960; 46: 1533-1542.

**Hunter W.** On the structure and diseases of articulating cartilage. *Philos Trans R Soc Lond* 1743; 42b: 514-521.

**Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU.** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238:265-272.

**Kim YJ, Sah RL, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD.** Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311:1-12.

**Lamerigts NM, Buma P, Huiskes R, Schreurs W, Gardeniers J, Slooff TJ.** Incorporation of morsellized bone graft under controlled loading conditions. A new animal model in the goat. *Biomaterials* 2000; 21:741-747.

**Lee DA, Noguchi T, Frean SP, Lees P, Bader DL.** The influence of mechanical loading on isolated chondrocytes seeded in agarose constructs. *Biorheology* 2000; 37:149-161.

**Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI.** Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 187:345-355.

**Li KW, Falcovitz YH, Nagrampa JP, Chen AC, Lottman LM, Shyy JY, Sah RL.** Mechanical compression modulates proliferation of transplanted chondrocytes. *J Orthop Res* 2000; 18:374-382.

**Lippiello L, Kaye C, Neumata T, Mankin HJ.** In vitro metabolic response of articular cartilage segments to low levels of hydrostatic pressure. *Connect Tissue Res* 1985; 13:99-107.

**Maroudas AI.** Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* 1976; 260:808-809.

**Martin I, Shastri VP, Padera RF, Yang J, Mackay AJ, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE.** Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:229-235.

**Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB, Hung CT, Ateshian GA.** Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng* 2000; 122:252-260.

**Mizuno S, Glowacki J.** Chondroinduction of human dermal fibroblasts by demineralized bone in three-dimensional culture. *Exp Cell Res* 1996; 227:89-97.

**Mow VC, Holmes MH, Lai WM.** Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984; 17:377-394.

**Nehrer S, Spector M, Minas T.** Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop* 1999; 149-162.

- Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B.** Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2631-2637.
- O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS, Commisso CN.** Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res* 1997; 15:682-687.
- Osiecka-Iwan A, Hyc A, Moskalewski S.** Immunosuppression and rejection of cartilage formed by allogeneic chondrocytes in rats. *Cell Transplant* 1999; 8:627-636.
- Panossian A, Ashiku S, Kirchhoff CH, Randolph MA, Yaremchuk MJ.** Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108:392-402.
- Pazzano D, Mercier KA, Moran JM, Fong SS, DiBiasio DD, Rulfs JX, Kohles SS, Bonassar LJ.** Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol Prog* 2000; 16:893-896.
- Perka C, Schultz O, Sittinger M, Zippel H.** Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. *Orthopäde* 2000; 29:112-119.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A.** Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000; 212-234.
- Prendergast PJ, Huiskes R, Söball.** ESB Research Award 1996. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces. *J Biomech* 1997; 30:539-548.
- Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA.** Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994; 23:49-53.
- Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B.** Modulation of commitment, proliferation, and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium. *Endocrinology* 1997; 138:4966-4976.
- Ragan PM, Chin VI, Hung HH, Masuda K, Thonar EJ, Arner EC, Grodzinsky AJ, Sandy JD.** Chondrocyte extracellular matrix synthesis and turnover are influenced by static compression in a new alginate disk culture system. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383:256-264.
- Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M.** Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998; 42:347-356.
- Rudert M, Moller HD, Schulze M, Wirth CJ.** Tissue Engineering zur Therapie von osteochondralen Knorpelläsionen. *Zentralbl Chir* 2000; 125:509-515.
- Sachs E, Cima, M, Williams, P, Brancazio, D, and Cornie, J.** 3-Dimensional printing-rapid tooling and prototypes directly from a CAD model. *J Eng Industry* 114, 481-488. 1992.
- Schöttle PB, Oetl GM, Agneskirchner JD, Imhoff AB.** Operative Therapie von osteochondralen Läsionen am Talus mit autologer Knorpel-Knochen-Transplantation. *Orthopäde* 2001; 30:53-58.

- Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR.** Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994; 15:451-456.
- Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR.** Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 1996; 17:237-242.
- Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J.** Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996; 33:57-63.
- Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bunger C.** Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *J Bone Joint Surg Br* 1993; 75:270-278.
- Steinmeyer J, Knue S.** The proteoglycan metabolism of mature bovine articular cartilage explants superimposed to continuously applied cyclic mechanical loading. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240:216-221.
- Tagil M, Aspenberg P.** Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. *J Orthop Res* 1999; 17:200-204.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
- Uchida A, Yamashita K, Hashimoto K, Shimomura Y.** The effect of mechanical stress on cultured growth cartilage cells. *Connect Tissue Res* 1988; 17:305-311.
- Veldhuijzen JP, Huisman AH, Vermeiden JP, Prahl-Andersen B.** The growth of cartilage cells in vitro and the effect of intermittent compressive force. A histological evaluation. *Connect Tissue Res* 1987; 16:187-196.
- Verbruggen G, Veys EM, Wieme N, Malfait AM, Gijssels L, Nimmegheers J, Almqvist KF, Broddelez C.** The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentrations of agarose. *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8:371-378.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM.** Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76:579-592.
- Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B.** The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80:1745-1757.
- Young HE, Ceballos EM, Smith JC, Mancini ML, Wright RP, Ragan BL, Bushell I, Lucas PA.** Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; 29A:723-736.
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black ACJ, Reagan CR, Lucas PA.** Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 1995; 202:137-144.

## 7. Anhang

### • Informations- und Aufklärungsbogen Knochenmarkentnahme

Klinikum Großhadern  
Orthopädische Klinik und Poliklinik  
Direktor: Prof. Dr. H. J. Refior

Klinikum Großhadern - Orthopädie - 81366 München

\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig \_\_\_\_\_  
Maximilians \_\_\_\_\_  
Universität \_\_\_\_\_  
München \_\_\_\_\_

81377 München  
Marchioninstraße 15  
Durchwahl: (0 89) 70 95-

### **AUFKLÄRUNG und EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG** über die Entnahme einer Knochenmarkprobe zur wissenschaftlichen Grundlagenforschung

Sehr geehrte/r Frau/Herr \_\_\_\_\_,

während der bei Ihnen vorgesehenen Operation wird Knochen aus dem Becken zur Transplantation an eine andere Körperstelle entnommen werden.

Wir bitten Sie, uns zu erlauben, während dieses Eingriffes eine ca. 50 ml große Knochenmarkprobe zu entnehmen und zur Forschung zur Verfügung zu stellen. Vorgesehen ist, mit den entnommenen Zellen den Aufbau von Knorpel-/Knochenkonstrukten zu versuchen um letztlich in der Zukunft den Einbau von Gelenkprothesen eventuell durch biologische, körpereigene Materialien vermeiden oder hinauszögern zu können.

Die entnommenen Gewebezellen werden hierzu weiter verarbeitet, unter bestimmten Bedingungen vermehrt, untersucht und eventuell auch konserviert. Diese Arbeiten mit dem von Ihnen gewonnenen Zellgewebe dienen dabei ausschließlich wissenschaftlichen Zwecken. Die Entnahme der geringen Menge von 10 ml Knochenmark während der geplanten Knochenentnahme ist dabei für Sie in keiner Weise von Nachteil. Zu Zwecken der nachvollziehbaren Dokumentation bitten wir Sie auch, uns Ihre persönliche Daten (Name, Geburtsdatum, Art und Datum der Operation) protokollieren zu lassen. Selbstverständlich werden diese nur den im Rahmen des Forschungsvorhabens tätigen autorisierten Personen zugänglich sein.

Wir weisen Sie ausdrücklich darauf hin, daß Ihre Erlaubnis zur Gewebeentnahme freiwillig ist, und Sie jederzeit Ihr Einverständnis zurückziehen können. Irgendwelche Nachteile entstehen Ihnen hierdurch nicht. Wir bedanken uns sehr für Ihre Mitwirkung !

Ich habe diese Aufklärung über die geplante Entnahme einer Knochenmarkprobe genau gelesen, alle meine Fragen sind ausreichend beantwortet worden, und ich bin mit der Entnahme einverstanden. Eine Kopie dieses Bogens wurde mir ausgehändigt. Ich habe zur Kenntnis genommen, daß ich bei weiteren Fragen jederzeit meinen behandelnden Arzt ansprechen kann. Ich wurde darüber informiert, daß meine Erlaubnis zur Knochenmarkentnahme freiwillig ist. Ich kann sie jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne persönliche Nachteile zurückziehen. Ich bin damit einverstanden, daß meine persönlichen Daten (Name, Geburtsdatum, Art und Datum der Operation) protokolliert werden. Eine kommerzielle Nutzung des bei mir entnommenen Gewebes findet nicht statt. Ansprüche, gleich welcher Art, an den Ergebnissen der mit meinen Gewebe erzielten Forschungen stelle ich nicht.

München, den \_\_\_\_\_

Unterschrift Patient/-in: \_\_\_\_\_

München, den \_\_\_\_\_

Unterschrift Arzt/Ärztin: \_\_\_\_\_

ORITHI T 04

Postanschrift:  
D-81366 München

Fernsprecher (Vermittlung):  
(0 89) 70 95 - 1

Telefax:  
(0 89) 70 95 - 88 81

Öffentliche Verkehrsmittel:  
U-Bahn: Linie 6 Klinikum Großhadern  
Bus: Linien 34, 65, 67 und 68



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Pavlina Raisl, geb. Rajzlová  
Wohnort: Tutzingenstr. 6, 81369 München  
Geburtsdatum: 23.05.1972  
Geburtsort: Krnov (CZE)  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1978 - 1986 Grundschule Písek (Sprachklasse: Russisch und Englisch)  
1986 - 1992 naturwissenschaftliches und sportliches Gymnasium in Prerov (CZE)  
1992 Allgemeine Hochschulreife, Abitur

### **Studium**

1996 - 1997 Studienkolleg an der LMU München  
1997 - 2004 Humanmedizin an der LMU München  
Studienschwerpunkte: Orthopädie, Chirurgie, Sportmedizin  
03/2000 Ärztliche Vorprüfung  
03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotion:

experimentelle Arbeit im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der LMU München

### Thema der Dissertation:

Differenzierungsmuster von Chondrozyten und Knochenmarkstammzellen in der Langzeitperfusionskultur unter mechanischer Belastung

### Doktorvater:

Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson und Priv.-Doz. Dr. med. H.R. Dürr

### **Berufliche Tätigkeiten**

1985 - 1997 Profi-Tennisspielerin in der offiziellen Damen-Weltrangliste (WTA)  
seit 8/1994 Tennistrainerin  
04/1999 - 08/2002 Zahnarztpraxis Dr. Dr. N. Buchheim - EDV-Betreuung  
05/1995 - 08/2002 Immobilien und Hausverwaltung A. Schultheiß - EDV – Betreuung  
seit 04/2002 Mentasan® - Projektmanagerin und Fachreferentin  
seit 08/2004 Ärztin im Praktikum im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching, Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie (Chefarzt Prof. Dr. H. Hertlein)

### **Spezifische Fachkenntnisse**

Tennistrainerin: B - Trainerlizenz (Deutscher Tennis Bund) 1996  
B - Trainerlizenz (Tschechischer Tennis Bund) 1992

München, Oktober 2004