

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
(Vorstand: Professor Dr. A. Berghaus)

DER EINFLUSS VON IGF-1 UND TGF $\beta$ -2 AUF TISSUE-ENGINEERTEN  
HUMANEN SEPTUMKNORPEL

-Eine experimentelle Untersuchung-

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Daniel Skodacek  
aus  
München  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer

Mitberichterstatter Prof. Dr. med. E. Fink  
Prof. Dr. med. G. Enders  
Prof. Dr. Dr. U. Welsch

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. N. Rotter

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.05

MEINEN ELTERN  
GEWIDMET

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Knorpelbedarf und Knorpelersatz.....	1
1.2	Knorpelersatz durch Tissue Engineering.....	3
1.2.1	Trägermaterialien.....	4
1.2.2	Kulturbedingungen.....	6
1.3	Fragestellung.....	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Patientendaten.....	10
2.2	Trägermaterialien.....	10
2.3	Wachstumsfaktoren.....	11
2.3.1	IGF-1.....	11
2.3.2	TGFβ-2.....	11
2.4	Zellkulturtechniken.....	12
2.4.1	Knorpelgewinnung.....	12
2.4.2	Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen.....	12
2.4.3	Monolayer-Kultur.....	12
2.4.4	3-D-Kultur in Ethisorb E 210 Vliesen.....	13
2.5	Tiermodell.....	14
2.6	Versuchsablauf.....	15
2.7	Versuchsgruppen.....	16
2.8	Quantifizierung des Einflusses der Wachstumsfaktoren.....	17
2.8.1	Gewicht.....	17
2.8.2	Biochemische Verfahren.....	17
2.8.2.1	Papainverdau.....	17
2.8.2.2	Quantifizierung der Glykosaminoglykane.....	17
2.8.2.3	Bestimmung des Hydroxyrolingehalts.....	18
2.8.2.4	Bestimmung des DNA-Gehaltes.....	19
2.9	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	20
2.9.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	20
2.10	Statistik.....	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Knorpelisolierung und Monolayer-Kultur.....	22
3.2	3-D-Kultur.....	22

3.3	Tiermodell .....	22
3.4	Morphologie der Vliese.....	23
3.4.1	Makroskopische Morphe und Resorptionsverhalten in vivo .....	23
3.4.2	Mikroskopische Morphe .....	26
3.4.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
3.5	Gewichte und biochemische Methoden.....	29
3.5.1	Gewicht .....	30
3.5.2	Biochemische Methoden.....	34
3.5.2.1	Zellzahl.....	34
3.5.2.2	Glykosaminoglykane .....	38
3.5.2.3	Hydroxyprolin .....	42
4	Diskussion .....	47
4.1	Wachstumsfaktoren und Knorpel .....	47
4.2	Verhalten der Konstrukte in vitro .....	50
4.3	Verhalten der Konstrukte in vivo.....	53
4.3.1	Gewicht .....	53
4.3.2	Zellzahl.....	54
4.3.3	Glykosaminoglykan und Hydroxyprolin .....	54
4.4	Diskussion der quantitativen Ergebnisse.....	55
4.5	Wahl des Trägermaterials .....	59
4.6	Ausblick und Perspektiven .....	61
5	Zusammenfassung .....	64
6	Literaturverzeichnis .....	66
7	Lebenslauf.....	80
8	Danksagung .....	81

# Abkürzungen

<b>DMB</b>	1,9-Dimethylmethylenblau
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Minimal Essential Medium
<b>ECM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>EGF</b>	Epithelial growth factor
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykane
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>PDGF</b>	Platelet-derived Growth Factor
<b>PDS</b>	Polydioxanon
<b>PGA</b>	Polyglykolat
<b>PLA</b>	Polylaktat
<b>SEM</b>	Standard Error of Mean = Standardfehler
<b>TEN</b>	Tris, EDTA, NaCl
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>H.-E.</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung

# 1 Einleitung

## 1.1 Knorpelbedarf und Knorpelersatz

Es besteht weitgehender Konsens über die eingeschränkte Fähigkeit zur Selbstheilung von Knorpelgewebe [15, 39, 50, 115]. Beispielsweise wird defekter Gelenkknorpel durch mechanisch minderwertigen Faserknorpel ersetzt und macht traumatischen oder degenerativen Knorpelverlust bis heute nicht vollständig heilbar [21, 77, 90, 91]. Nicht nur hyaliner Gelenkknorpel, sondern auch der formgebende Strukturknorpel im Kopf-Hals-Bereich ist mit dem Mangel geringer Regenerationsfähigkeit behaftet [145]. In dieser Region des menschlichen Körpers sind Substanzdefekte funktionell wie ästhetisch besonders schwerwiegend und führen zusätzlich zu einem großen Verlust an Lebensqualität. Daher besteht neben der Orthopädie auch in der Kopf-Hals-Chirurgie großer Bedarf an Knorpelgewebe für rekonstruktive Eingriffe. Es wird beispielsweise bei der Aufrichtung von Sattelnasen, der Rekonstruktion des Orbitarandes oder der Wiederherstellung des Orbitabodens nach Blow-Out-Fraktur benötigt [13, 60, 63, 68]. Weitere Einsatzmöglichkeiten bestehen in der plastisch-rekonstruktiven Therapie der Mikrotie oder des traumatischen Ohrmuschelverlustes, in der Mittelohrchirurgie und der Defektdeckung nach Trauma oder Tumorresektion im Gesichtsbereich [4, 99].

Zu den etablierten Methoden des Knorpelersatzes in diesem Bereich gehört die Transplantation von Knorpelgewebe oder Ersatzmaterialien unterschiedlicher Herkunft. Im Rahmen autologer Transplantationen wird körpereigenes Gewebe innerhalb eines Individuums verpflanzt. Mit diesem Verfahren kann Knorpelgewebe ohne nennenswertes Infektionsrisiko und ohne die Gefahr immunologisch bedingter Gewebsreaktionen zur Defektdeckung oder Rekonstruktion genutzt werden, was dieses Gewebe zum Transplantatmaterial der ersten Wahl macht [68]. Neben diesen gewichtigen Vorteilen hat autologes Gewebe aber auch einige Nachteile. So steht Knorpelgewebe nicht immer in ausreichendem Umfang oder gewünschter Qualität zur Verfügung, zudem ist meist ein zweiter Eingriff zur Gewinnung des Gewebes nötig [55]. Zusätzlich muss das Spendergewebe bei einigen Applikationen gewisse strukturelle Voraussetzungen erfüllen, was zum Teil weitreichende Manipulationen am Knorpel zur Folge hat. So ist beispielsweise bei der rekonstruktiven Therapie der Mikrotie vom Operateur großes handwerkliches Geschick von Nöten, um bei der

Formung des Spenderknorpels ein gutes kosmetisches Ergebnis zu erzielen. Dies ist zusätzlich mit Risiken für die mechanische Integrität des Spendergewebes verbunden [93]. Überdies besteht besonders bei der Verwendung von autologem Rippenknorpel die Gefahr postoperativer Verkalkung mit negativen Einflüssen auf das rekonstruktive Ergebnis [57].

Allogene Transplantate spielen in der rekonstruktiven Chirurgie, neben der Verpflanzung autologer Gewebe, eine gewisse Rolle [60, 68]. Hierbei wird Gewebe eines anderen Individuums der gleichen Spezies verwendet. Der Einsatz allogenen Gewebes erspart dem Patienten zusätzliche Operationsmorbidity, darüber hinaus steht es in weit größerem Ausmaß als autologer Knorpel zur Verfügung. Zum Ausschluss, zumindest aber zur Verminderung von Abstoßungsreaktionen oder Infektionsübertragungen, muss das gespendete Gewebe konserviert werden. Im klinischen Alltag haben sich die Verwendung von Merthiolat- und Cialit-Lösungen bewährt. Allerdings kann damit die Übertragung von Slow-Virus- und HIV-Infektionen oder subzellulären Erregern wie Prionen nicht sicher ausgeschlossen werden [13, 24, 27, 93], wodurch ihr Einsatz heutzutage kritisch beurteilt werden muss [26]. Sowohl bei autologen als auch bei allogenen Transplantaten kann es in situ zu Resorptionserscheinungen und Transplantatlösungen kommen. Die Wahl des geeigneten Transplantatmaterials ist somit von Fall zu Fall vom Operateur unter Berücksichtigung der Gesichtspunkte Form, Größe, Ort der Materialentnahme und des Empfängerbetts, Infektionsgefahr und Narbenbildung immer wieder aufs Neue zu entscheiden [60, 68].

Xenogene Gewebe finden als Knorpelersatz kaum Verwendung und werden nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Es handelt sich dabei um die Übertragung von Knorpel eines Individuums einer anderen Spezies. Berichte über den klinischen Einsatz konservierten Rinderknorpels zeigen verhältnismäßig hohe Resorptions- und Infektionsraten [32, 67, 71, 89, 95]. Aufgrund der Verfügbarkeit überlegener Verfahren ist der Einsatz tierischen Materials im Rahmen der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie nicht zu befürworten [13, 26, 68].

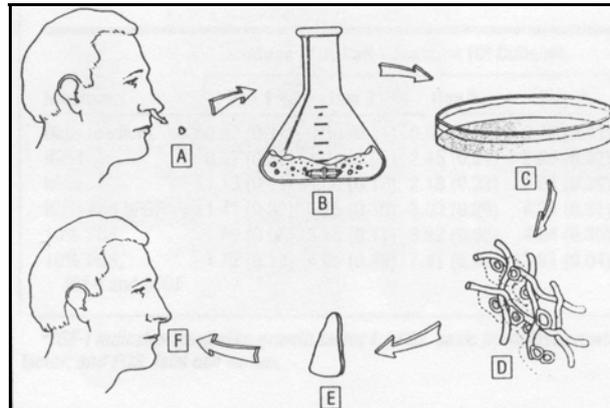
Die Verwendung körperfremder, synthetischer Materialien bezeichnet man als alloplastische Implantationen. In einigen operativen Disziplinen werden diese Implantate als Knorpelersatz häufig angewendet. Als Beispiel sei der totale alloplastische Gelenkersatz genannt, welcher in der Orthopädie zur Routine gehört. Auch in der Kopf-Hals-Chirurgie werden körperfremde Implantatmaterialien für

verschiedene Zwecke benutzt. Diverse Kunststoffe, wie Polyethylen oder dessen Derivat Teflon, können in der Rekonstruktion der Ohrmuschel, zur Deckung von Orbitabodendefekten oder der Anhebung des Nasenrückens eingesetzt werden [98]. Die Benutzung metallischer Implantate wird beispielsweise bei der Therapie der Tracheomalazie in Form von Tracheastents verfolgt [7]. Alloplastische Materialien sind in praktisch unbegrenztem Umfang vorhanden und lassen sich in gewünschten Formen und Größen herstellen. Die Operationsdauer kann auf den Vorgang der Implantation beschränkt werden, weitere Eingriffe zur Gewebegewinnung entfallen. Ein großer Nachteil dieser Implantate besteht aber in der hohen Infektionsgefahr, ungenügender Fixierung im Transplantatbett und der Gefahr immunologischer Reaktion und der Implantatabstoßung [55].

## **1.2 Knorpelersatz durch Tissue Engineering**

Wie oben dargelegt, sind alle gängigen Behandlungsmethoden für die Therapie von Knorpelverlusten mit relevanten Nachteilen behaftet. Daraus ergibt sich der Bedarf an neuen, alternativen Verfahren des Knorpelersatzes. Tissue Engineering könnte den Einsatz patientenindividueller Gewebe ermöglichen, die frei vom Risiko einer Infektion oder einer Immuninkompatibilität sind und gleichzeitig nur minimale Spendermorbidity bedingen. Tissue Engineering ist ein interdisziplinärer Forschungszweig mit der Zielsetzung, durch den Einsatz von Zellen, in Verbindung mit natürlichen oder synthetischen Komponenten, die Funktion von Körpergeweben zu ersetzen, aufrecht zu erhalten oder zu verbessern [123]. Dies setzt die Zusammenarbeit zwischen Fachleuten mehrerer Disziplinen wie der Biologie, der Chemie und Physik sowie der Materialforschung voraus [5]. Seit einigen Jahren ist auch die Herstellung von Knorpelgewebe mit den Methoden des Tissue Engineering möglich [19]. Im Prinzip werden bei dieser Technik Knorpelzellen aus einem Spendergewebe enzymatisch isoliert, bei Bedarf vermehrt und anschließend in dreidimensionale Trägermaterialien übertragen, welche idealerweise nach Größe und Form exakt den Bedürfnissen des Empfängers entsprechen (Abb. 1). In dieser dreidimensionalen Umgebung können Knorpelzellen extrazelluläre Matrix synthetisieren und somit ein Gewebe produzieren, das von nativem Knorpel kaum mehr zu unterscheiden ist [55, 112]. Trotz dieser optimistischen Aussage müssen Mittel und Wege zu Verbesserung der Qualität des gezüchteten Knorpels gefunden

werden. Dies beinhaltet die weitere Analyse geeigneter Trägermaterialien sowie den Einsatz optimierter Kulturbedingungen.



**Abbildung 1**

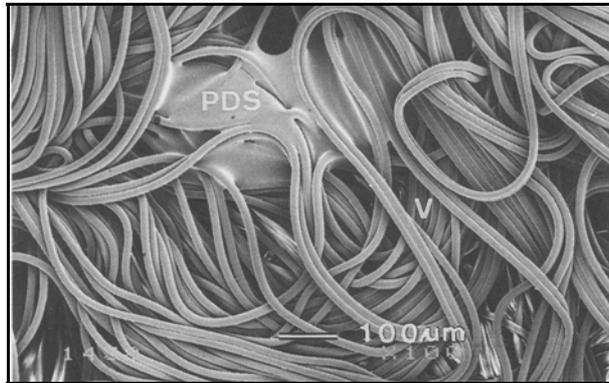
Darstellung der zur Knorpelzüchtung nötigen Schritte. Nach Gewinnung von Knorpelgewebe durch eine Biopsie (A) werden die Chondrozyten enzymatisch isoliert (B). Überwiegend ist danach eine Vermehrung der Zellen in Monolayer-Kultur nötig (C). Anschließend werden diese in ein geeignetes Trägermaterial übertragen (D). In dreidimensionaler Kulturmgebung bilden die Chondrozyten wieder einen knorpelartigen Phänotyp aus und synthetisieren extrazelluläre Matrix (E). Die Zugabe von Wachstumsfaktoren in dieser Phase könnte die Reifung des Konstrukts zu einem implantierbaren Gewebe (F) fördern und/oder beschleunigen. Modifiziert nach [27].

### 1.2.1 Trägermaterialien

Um Knorpeltransplantate geeigneter Größe herzustellen, bedarf es im Allgemeinen einer Vermehrung der initial aus einer wenig traumatischen Biopsie gewonnenen Chondrozyten. Die schnelle Vermehrung der Chondrozyten ist in Monolayer-Kultur ohne größere Probleme möglich [19, 72, 121, 134]. Jedoch verlieren die Zellen nach mehreren Zellteilungen unter diesen Kulturbedingungen ihre knorpelspezifischen Synthesefähigkeiten [51, 147]. Dieses als Dedifferenzierung bezeichnete Phänomen ist nach Übertragung in ein dreidimensionales Kultursystem zumindest teilweise reversibel [3, 6]. Derartige Kultursysteme sind demnach Voraussetzung für die Züchtung knorpelartiger Gewebe in vitro [122]. Sie stehen in mehreren Formen zur Verfügung [6, 23, 37, 59, 90, 121, 132].

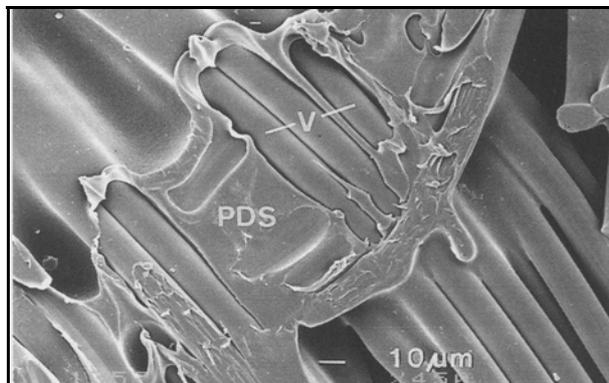
Für den Einsatz in vitro und später auch in vivo muss das Trägermaterial den Chondrozyten stabile Rahmenbedingungen bieten, um eine zweckmäßige räumliche Organisation des zu züchtenden Gewebes sowie eine ungehinderte Matrixdeposition zu ermöglichen. Des Weiteren stellt das Trägermaterial die Matrize für die letztendlich gewünschte Form und Größe des Gewebes dar [18, 64]. Der Zellträger soll im Grunde nur vorübergehend eine Stütz- und Leitstruktur darstellen, und nach Reifung des gezüchteten Gewebes immer weniger die mechanischen Eigenschaften des Konstruktes beeinflussen [13, 16]. Der Einsatz vollresorbierbarer Werkstoffe liegt

also – vor allem für den Einsatz in vivo – nahe. Vliese aus Polymerfasern wie Polylaktid, Polyglykolid oder deren Copolymer haben sich in der Vergangenheit in mehreren Studien als geeignete Trägerstrukturen für Knorpelzellen erwiesen [18, 37, 69, 82, 83, 101, 120, 121, 133]. Die Bioverträglichkeit dieser Polymere und ihrer Zerfallsprodukte ist gut dokumentiert [18, 122].



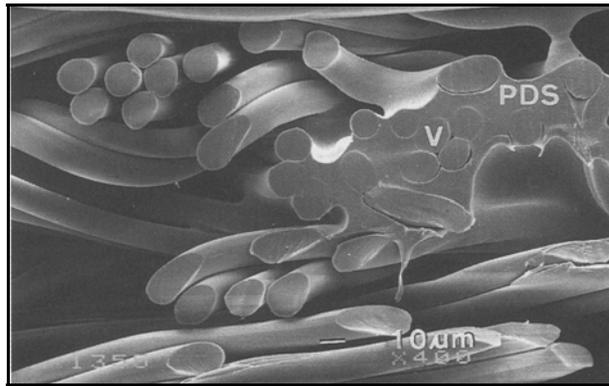
**Abbildung 2**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Ultrastruktur des Trägermaterials Ethisorb. Neben den Vicrylfasern (V) sind auch die Verklebungen aus Polydioxanonschmelzen (PDS) gut zu erkennen. Die Abbildungen 2, 3 und 4 wurden freundlicherweise von der Firma Ethicon, Norderstedt, D zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 3**

Elektronenmikroskopische Darstellung des Zellträgermaterials. Längs getroffene Vicrylfasern (V) sind über ein geschmolzenes Polydioxanon (PDS)-Partikel miteinander verbunden. Die Bedeutung des Gehalts an PDS für die mechanische Stabilität der Ethisorbvliese wird verständlich.



**Abbildung 4**

Querschnitt einer PDS-Schmelze (PDS) mit eingeschlossenen Vicrylfasern (V).

Trotz der ermutigenden Ergebnisse ist das optimale Trägermaterial noch immer nicht gefunden [96, 127, 132]. Auch ist noch nicht klar, inwieweit die mechanische und chemische Degradation der Trägerstrukturen die Entwicklung des tissue-engineerten Gewebes *in vivo* beeinflusst. Die gezielte Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften synthetischer Trägermaterialien kann zur weiteren Untersuchung dieser Einflussgrößen genutzt werden.

### 1.2.2 Kulturbedingungen

Wie oben erwähnt, ist die Vermehrung von Chondrozyten mit dem Problem der Dedifferenzierung der Zellen belastet [6, 51, 147]. Um Knorpeltransplantate brauchbarer Größe herzustellen, ist diese Amplifikationsphase jedoch unerlässlich. Im weiteren Verlauf der Züchtung von Knorpel *in vitro* kommen verschiedene Kultursysteme zum Einsatz, welche die Redifferenzierung der Zellen und die Reifung des Zellverbundes zu einem Gewebe fördern sollen.

Freed benutzt zur Kultivierung von Zell-Copolymer-Konstrukten in dreidimensionaler Kultur die sogenannte „Spinner-flask“-Kultur. Dabei wird das mit Zellen beladene Trägermaterial in einem Mischgefäß befestigt und unter ständigem Rühren des Nährmediums kultiviert. Dies führt im Vergleich zu statischen Kulturmethoden zu signifikant besseren Ergebnissen, vermutlich durch verbesserten Stofftransport zwischen Medium und Zellen sowie dem Einwirken mechanischer Stimuli auf das Konstrukt [39].

Eine Weiterentwicklung des „Spinner flask“-Systems stellt der rotierende Bioreaktor dar. Hier werden die gesamten Konstrukte in einem mediumgefüllten Behälter durch Rotation in Bewegung gehalten und somit in einen Zustand des kontinuierlichen freien Falls versetzt. Durch die teilweise Aufhebung der Gravitationswirkung kann

eine gleichmäßigere Zellverteilung im Trägermaterial und die Ablagerung einer hochwertigen extrazellulären Matrix erreicht werden [39, 41].

Ein weiterer Versuch zur Optimierung der Kulturbedingungen besteht im Einsatz des Perfusionskultursystems. Dabei werden Knorpelzellen auf Trägermaterialien in eine, permanent von Medium durchströmte Kulturkammer verbracht, die es ermöglicht, die Umweltbedingungen der Chondrozyten in einem engen Rahmen konstant zu halten. Sittinger berichtet von guter Matrixdeposition bei der Verwendung humaner Gelenkchondrozyten [120]. Naumann und Rotter bestätigen diese Erkenntnisse in getrennten Experimenten an humanen Septumchondrozyten in Perfusionskultur [87, 110].

Neben der Benutzung verschiedener, aufwendiger Zellkulturanordnungen besteht auch die Möglichkeit, die Redifferenzierung von vermehrten Chondrozyten mit Hilfe von Wachstumsfaktoren zu optimieren [94, 138, 139]. Wachstumsfaktoren sind (Poly-)Peptide oder Proteine, die von vielen Zellen und Zellgruppen synthetisiert werden und in vielfältiger Weise die Proliferation und Differenzierung der verschiedensten Zelltypen beeinflussen. Sie werden zu den sogenannten Gewebshormonen gezählt, da sie nicht von einer definierten Drüse, sondern von Einzelzellen beziehungsweise Zellgruppen produziert werden [74]. In vivo zirkulieren sie gebunden an spezifische Transportproteine oder liegen im Verbund mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix im Gewebe vor – unter anderem auch in Knorpelmatrix vor [52, 85, 97, 107, 108, 125, 136]. In dieser Form sind sie biologisch inaktiv und werden erst auf Grund bestimmter Umwelteinflüsse in ihre biologisch aktive Form überführt. Vermutlich wirken sie auf autokrinem und parakrinem Wege auf die Zielzellen.

Auf dem Gebiet des Tissue Engineering, versucht man sich die Wirkung von Wachstumsfaktoren in vielfältiger Weise zu Nutze zu machen. Die Eignung dieser Faktoren zur Beschleunigung der Zellproliferation in Monolayer-Kultur wird schon seit längerer Zeit geprüft und zeigt vielversprechende Ergebnisse [20, 25, 154]. Wachstumsfaktoren könnten somit einerseits die initial nötige Zellzahl vermindern, andererseits den Zeitraum zwischen der Gewinnung primärer Zellen und der Bereitstellung des implantierbaren Materials verkürzen [16]. Des Weiteren soll die Zugabe von Wachstumsfaktoren in die Zellkultur die Ausprägung bestimmter Merkmale und die Qualität und Quantität der Zellprodukte fördern [25, 124, 138, 140, 141]. Ebenso wird die Transfektion von Wachstumsfaktorgenen in die zu züchtenden

Zellen beschrieben [48-50, 124], um besonders schnell wachsende Gewebekulturen zu erhalten, welche ihrem Ursprungsgewebe möglichst ähnlich sind. Ein mit chemisch gebundenen Wachstumsfaktoren versetzter Platzhalter soll durch kontinuierliche Abgabe der Wirkstoffe das Einwachsen intakten Knorpels in einen Gelenkknorpeldefekt begünstigen [29, 88]. Ein immer besseres Verständnis des Knorpelstoffwechsels deutet auf eine gewichtige Rolle humoraler Wachstumsfaktoren in der Homöostase nativen Knorpels hin [79, 128, 129]. Mehrere Untersuchungen haben eine positive Wirkung von Wachstumsfaktoren auf den Stoffwechsel von explantiertem Knorpelgewebe in vitro belegt [43, 58]. Sowohl bei isolierten Zellen in Monolayer-Kultur [45, 80, 104], als auch in verschiedenen dreidimensionalen Kulturverfahren [8, 17, 152, 154] konnte eine vermehrte Synthese knorpelspezifischer Stoffwechselprodukte wie Kollagen II oder Glykosaminoglykanen durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren beobachtet werden. Studien zeigten, dass Wachstumsfaktoren bei embryonalen, aber auch adulten mesenchymalen Stammzellen zu einer chondrozytenartigen Differenzierung führen und somit bei Steuerung der Chondrogenese eine Rolle spielen [78, 97, 119].

Diese Ergebnisse lassen es sinnvoll erscheinen, Wachstumsfaktoren für die Induktion der Redifferenzierung und den Erhalt eines knorpelspezifisch differenzierten Phänotyps bei amplifizierten Knorpelzellen einzusetzen. Bedeutende chondrogene Vertreter dieser Wirkstoffe sind Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) sowie Transforming Growth Factor beta 2 (TGF $\beta$ -2). Jedoch sind die Wirkungen dieser Faktoren auf humane Zellen, besonders auf humane Nasenseptumchondrozyten noch wenig charakterisiert [17, 20, 28, 139]. In dieser Arbeit soll nun der Einfluss der Kombination der genannten Wachstumsfaktoren auf ein für die Bedürfnisse der Kopf-Hals-Chirurgie zugeschnittenes Kulturmodell samt in vivo Phase überprüft werden.

### **1.3 Fragestellung**

Die Zielsetzung dieser Untersuchung war demnach, den Effekt von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 auf amplifizierte humane Septumchondrocyten während der 3-D-Kultur in Vliesen aus synthetischen Copolymerfasern (Ethisorb) und nach Implantation in einen Versuchsorganismus zu analysieren. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Verwendung eines Trägermaterials mit kürzerer Degradationsdauer (PDS-reduzierte E 210 Vliese)

eine Auswirkung auf das gezüchtete Gewebe hat. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Hat die Zugabe von 0,2ng/ml TGF $\beta$ -2 und 50ng/ml IGF-1 zum Kulturmedium in der stationären 3-D-Kultur Einfluss auf die Entwicklung von tissue-engineerem humanen Septumknorpel in vitro und in vivo?
2. Ist ein Effekt bezüglich des Gewichts der Konstrukte zu erkennen?
3. Sind die Vliese nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren zellreicher als die Kontrollvliese?
4. Wird die Bildung von Glykosaminoglykanen durch Zugabe der Wachstumsfaktoren beeinflusst?
5. Unterscheidet sich die Konzentration von Hydroxyprolin in mit Wachstumsfaktoren behandelten Vliesen von der Kontrollgruppe?
6. Führt der Einsatz unterschiedlicher Trägermaterialien (E210 Vliese mit Standard PDS-Gehalt vs. E210 mit reduziertem PDS-Gehalt) zu Unterschieden im gezüchteten Knorpelgewebe?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientendaten**

Der verwendete Knorpel stammt von insgesamt 18 Patienten der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Kranke im Klinikum Großhadern, München. Davon waren 10 Patienten weiblichen und 8 Patienten männlichen Geschlechts. Das Alter der Patienten lag im Median bei  $27,5 \pm 13,8$  Jahren. Im Rahmen chirurgischer Eingriffe – die Patienten unterzogen sich einer Septumplastik bzw. einer Septorhinoplastik – fiel das zur Durchführung der Experimente benutzte Material an. Es wurde ausschließlich Gewebe verwendet, welches nach dem Eingriff verworfen worden wäre. Die Genehmigung der Ethikkommission der Universität München liegt vor. Nach der Entnahme des Knorpels im Rahmen der Operation, wurde dieser steril in DMEM bei  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **2.2 Trägermaterialien**

In dieser Arbeit kamen Zylinder aus Ethisorb 210 (Ethicon, Norderstedt, D) mit 8 mm Durchmesser und 3 mm Dicke als Zellträger zum Einsatz. Ethisorb ist ein synthetisches Copolymer aus Poly-L-Glykolat und Poly-L-Laktat (=Polyglactinfasern) im Verhältnis 9 : 1. Diese Fasern sind punktuell mit Polydioxanon (PDS) miteinander verklebt und bilden dadurch eine vliesartige, dreidimensionale Struktur. Die Vliese waren vom Hersteller mit Ethylendioxid sterilisiert worden. Die Bestandteile des Copolymers sind vollständig resorbierbar und werden schon seit Jahrzehnten in der Chirurgie unter anderem als Nahtmaterial, Markraumplombe oder Durapatch verwendet. Das Verhältnis zwischen Polyglactinfasern und den PDS-Verklebungspunkten hat Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Vliese und beeinflusst auch deren Stabilität in vivo [11, 116]. In der vorliegenden Untersuchung wurden zwei Gruppen von Vliesen mit (i) Standard Polyglactin-PDS-Verhältnis und (ii) einem reduzierten Anteil von PDS verwendet. Die Vliese wurden von der Firma Ethicon mit den jeweiligen PDS-Anteilen bereitgestellt.

## **2.3 Wachstumsfaktoren**

### **2.3.1 IGF-1**

In der vorliegenden Arbeit kam humaner Insulin-like Growth Factor-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) zum Einsatz, der rekombinant aus *Escherichia coli* hergestellt wurde. IGF-1 ist ein Polypeptid aus 70 Aminosäuren mit einem Gesamtgewicht von 7600 Dalton. Gängige Synonyme sind Somatomedin C oder basisches Somatomedin. Der Faktor gilt als starker anaboler Faktor im Knorpelstoffwechsel und wird im Rahmen des Tissue Engineering häufig eingesetzt [58, 62, 128, 152].

IGF-1 wurde nach den Angaben des Herstellers rekonstituiert und in Kulturmedium auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. In sterilen Eppendorffhütchen wurde der Wachstumsfaktor bei -30 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Dieser Wachstumsfaktor wurde dem Nährmedium während der 3-D-Kultur in der Konzentration von 50 ng/ml, in Übereinstimmung mit der Literatur [152] und Empfehlungen des Herstellers, zugegeben.

### **2.3.2 TGFβ-2**

Humaner Transforming-Growth-Factor-β-2 wurde von der Firma R&D Systems GmbH (Mannheim, D), bezogen. Er wurde rekombinant aus Myelomzellen der Maus, Zelllinie NSO, gewonnen. Der Faktor ist ein Homodimer aus zwei je 112 Aminosäuren langen Peptidketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das Gesamtgewicht von TGFβ-2 beträgt 25 kD. Seine Wirkung wird über einen membranständigen Rezeptor mit hoher Spezifität vermittelt. Dieses kleine Protein kommt in fast allen Säugetierzellen vor und stimuliert autokrin und parakrin das Wachstum und die Differenzierung besonders mesenchymaler Zellen [108, 125].

Der Wachstumsfaktor wurde nach Herstellerangaben rekonstituiert und anschließend zu Konzentrationen von 2 µg/ml aliquotiert. Bis zur Zugabe zum Medium der 3-D-Kultur wurde diese Lösung in sterilen Eppendorffhütchen bei -30 °C eingefroren. In Zellkultur kam TGFβ-2 in einer Konzentration von 0,2 ng/ml im Kulturmedium zum Einsatz, was den Empfehlungen des Herstellers entspricht und sich in vergangenen Arbeiten als brauchbare Konzentration erwiesen hat [152].

## **2.4 Zellkulturtechniken**

### **2.4.1 Knorpelgewinnung**

In einer Petrischale wurde der Knorpel unter 10 ml Dulbecco's Minimal Essential Medium (Biochrom KG, Berlin, D), das mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom KG, Berlin, D) und 160 mg/l Gentamicin (Curasan Pharma AG, Kleinostheim, D) versetzt war mit einem Skalpell von Blut und Gewebsresten befreit und in etwa 1 mm<sup>3</sup> Stücke zerteilt. Der zerkleinerte Knorpel wurde für 16 h in einem Erlenmeyerkolben (Schott, Mainz, D) mit einer Enzymlösung aus 0,15 mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, D), 0,1 mg/ml Kollagenase (Biochrom KG, Berlin, D) und 2 mg/ml DNAse II (Paesel+Lorei GmbH & Co, Frankfurt, D) in 15 ml Medium inkubiert und dabei im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O-Sättigung aufbewahrt. Der Ansatz wurde mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Der Zellverdau wurde dann durch ein Kunststoffsieb der Porengröße 50 µm in ein 50 ml Polypropylen Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, F) filtriert und die gewonnene Lösung bei Raumtemperatur mit 1200 upm (Varifuge K, Heraeus Christ GmbH, Osterode, D) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in Vollmedium mit Hilfe einer gläsernen Pasteurpipette resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, auf Vitalität geprüft und anschließend in Monolayer ausgesät.

### **2.4.2 Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen**

Zur Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen wurde die Trypanblaumethode eingesetzt. Sie beruht auf dem Prinzip, dass eine wässrige 0,5%ige Trypanblaulösung (Fluka AG, Basel, CH) in beschädigte oder avitale Zellen eindringen kann, diese blau färbt und sie damit unterscheidbar macht. Vitale Zellen färben sich nicht an. Trypanblau und eine Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und in eine Neubauer Zählkammer des Rauminhalts 0,5 µl gefüllt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen von 10 Feldern unter dem Lichtmikroskop (Leica Diavert, Wetzlar, D) bestimmt. Zur Vermeidung von Niederschlägen wurde die Trypanblaulösung vor jeder Benutzung 5 min mit 1000 upm zentrifugiert.

### **2.4.3 Monolayer-Kultur**

Isolierte Zellen wurden in einer Dichte von 10000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Polypropylen-Zellkulturflaschen verschiedener Grundflächen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>) (Nalge

Nunc Int., DK) ausgesät und im Zellkulturschrank unter gängigen Bedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Wasserdampfsättigung) inkubiert. Der Flaschenverschluss wurde zum Zwecke des Gasaustausches nur locker aufgesetzt. Als Kulturmedium kam Dulbecco's Minimal Essential Medium (Biochrom KG, Berlin, D), versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom KG, Berlin, D) und 160 mg/l Gentamicin (Gencin 80, Curasan Pharma AG, Kleinostheim, D) zur Anwendung, welches alle 3 bis 4 Tage gewechselt wurde.

Kurz vor Erreichen der Konfluenz, nach ca. 2 Wochen (15 ± 0,47 Tage) in Kultur, wurde das Medium abgesaugt, die Flasche zweimal mit PBS (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D) gespült und die Zellen mit einer 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, D), (1 ml für 25 cm<sup>2</sup>, 2 ml für 75 cm<sup>2</sup>, 3 ml für 175 cm<sup>2</sup>) abgelöst. Nach 10 min im Inkubator wurden 5 ml Vollmedium\* zugegeben, um die Trypsinwirkung zu antagonisieren. Die Zellsuspension wurde nach mehrmaligem Spülen der Kulturflasche, und mikroskopischer Sichtkontrolle in ein Zentrifugenröhrchen verbracht und für 10 min mit 1200 upm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde, wie oben beschrieben, mit Vollmedium resuspendiert und noch einmal die Zellzahl mit der Trypanblaumethode bestimmt.

#### **2.4.4 3-D-Kultur in Ethisorb E 210 Vliesen**

Nach der Amplifikation der Knorpelzellen in Monolayer-Kultur, wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in vollresorbierbare Ethisorb E 210 (Ethicon, Norderstedt, D) Vliese mit einem variierenden Anteil an Polydioxanon eingesetzt. Dabei wurde die entsprechende Zahl Zellen in 120 µl Medium suspendiert und mit dem Vlies in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingebracht. Dies entspricht einer Zelldichte von 33 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml Vliesvolumen, was erfahrungsgemäß einen brauchbaren Wert darstellt [8, 82, 84, 93]. Mit einer Pasteurpipette wurde das Vlies mehrmals gewendet bis die Suspension vollständig durch Kapillarwirkung vom Trägermaterial aufgenommen war. Um eine Adhärenz der Zellen an die Fasern der Trägerstruktur zu ermöglichen, wurden die Vliese etwa 1 h stehen gelassen. Die beladenen Vliese wurden in Multiwell-Kulturplatten (Nalge Nunc Int., DK) deponiert und in der Versuchsgruppe mit 5 ml Medium aus DMEM + 10 % FCS, 0,2 ng/ml TGFβ-2 (R&D Systems GmbH, Mannheim, D) 50 ng/ml IGF-1 (Roche, Mannheim, D) und 25 µg/ml Ascorbinsäure oder in der Kontrollgruppe nur mit Vollmedium und Ascorbinsäure versetzt und für 3

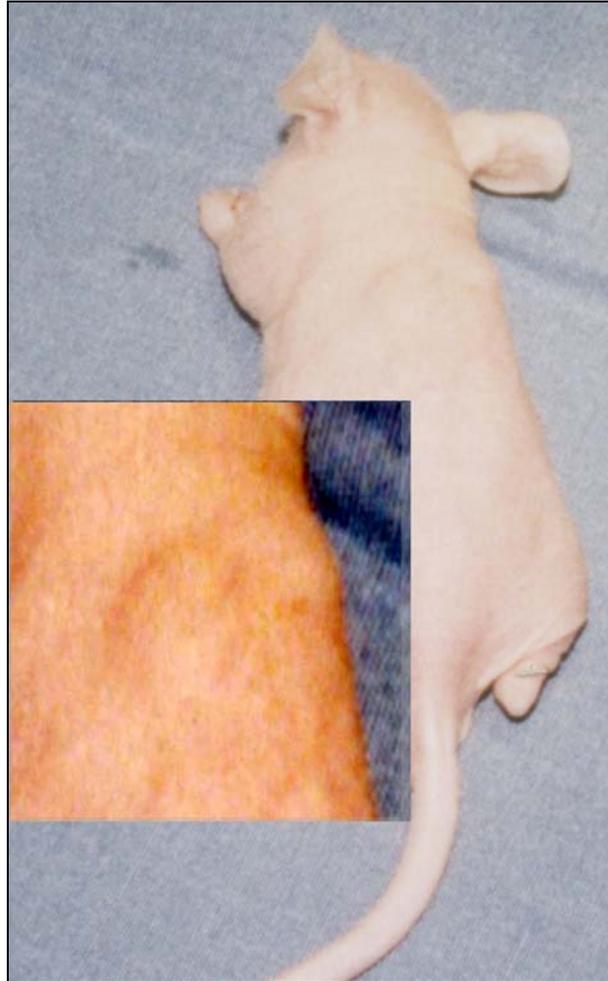
---

\* DMEM mit 10 % FCS und 160 mg/l Gentamicin

Wochen ( $21,5 \pm 1,1$  Tage) in vitro im Brutschrank kultiviert. Auch hier wurde das Kulturmedium alle 3 bis 4 Tage erneuert. Nach Abschluss der 3-D-Kultur wurden die Vliese entweder bis zur weiteren Verwendung zwischen sterilen Kompressen oberflächlich getrocknet und bei  $-30\text{ °C}$  in Polypropylenröhrchen eingefroren oder subkutan in den Rücken einer Nacktmaus implantiert, um ihr Verhalten in vivo zu untersuchen.

## **2.5 Tiermodell**

Es wurden 34 männliche homozygote thymusaplastische Nacktmäuse [33, 73], Stamm CD-1, nu/nu (Charles River Wiga, D-Sulzfeld) verwendet. Die Mäuse wurden in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in einem durchsichtigen Polycarbonkäfig (Makrolon®, W. Ehret, Emmendingen, D) der Größe 10 cm x 15 cm x 15 cm auf staubfreiem Weichholzgranulat (Ssniff, W. Ehret, Emmendingen, D) gehalten. Die Umweltbedingungen der Mäuse wurden bei  $26 \pm 2\text{ °C}$  Raumtemperatur sowie  $60 \pm 5\%$  relativer Luftfeuchte konstant gehalten. Licht erhielten die Käfige täglich zwischen 7.00 und 19.00 Uhr. Die Nahrung der Tiere bestand ausschließlich aus pelletierter, autoklavierter Alleindiät (Ssniff, W. Ehret, Emmendingen, D) und sterilem Leitungswasser aus Trinkflaschen ad libitum. Die Mäuse wurden ständig räumlich getrennt von den übrigen Versuchstieren unter einem Laminar Air Flow (Typ G1, W. Ehret, Emmendingen, D) gehalten.



**Abbildung 5**

Konstrukte im Tiermodell. Die Ausschnittvergrößerung zeigt die subkutan eingebrachten Vliese. Die Implantation wurde von den Versuchstieren gut toleriert. Die Implantationsstelle zeigt 12 Wochen post implantationem reizlose Wundverhältnisse.

## 2.6 Versuchsablauf

Nach drei Wochen in stationärer 3-D-Kultur wurden die Konstrukte subkutan in den Rücken der Nacktmäuse implantiert. Die Narkose der Versuchstiere erfolgte mittels Pentobarbital (Nembutal®, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Hannover, D) intraperitoneal in der Konzentration von 3 - 5 mg/100 g. Nach Wischdesinfektion der Haut wurde die Implantation unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Durch einen ca. 1,5 cm langen Hautschnitt im Bereich des Rückens wurde beidseits der Inzision eine subkutane Tasche präpariert und die Zell-Copolymer-Konstrukte eingebracht. Die Wunde wurde mit 3 Einzelknopfnähten verschlossen. Bis zur Explantation der Vliese wurde nicht an der Wunde manipuliert. Aufgrund des geringen Ausmaßes des Eingriffs wurde auf eine postoperative Analgesie verzichtet. Nach Abschluss der in vivo Phase wurden die Versuchstiere nach einer Narkotisierung durch zervikale Dislokation geopfert und die Vliese aus der

subkutanen Tasche extrahiert. Nach der Explantation wurden die Konstrukte mit einem Skalpell von Blut und Bindegewebskapsel befreit, zwischen zwei sterilen Kompressen oberflächlich getrocknet und fotografiert. Bis zur weiteren Verwendung lagerten sie ohne weitere Zusätze in Polypropylenröhrchen bei -30 °C.

## 2.7 Versuchsgruppen

Aus den Knorpelproben jedes Patienten wurden, in Abhängigkeit von der Größe des initial gewonnen Knorpelgewebes, vier bis acht Zell-Copolymer-Konstrukte hergestellt und zu drei Zeitpunkten (0 Wochen in vivo = nach dem Ende der 3-D-Kultur, 4 Wochen in vivo und 12 Wochen in vivo) untersucht. Jeweils die Hälfte der mit Knorpelzellen eines Patienten besiedelten Vliese wurde während der 3-D-Kultur mit Wachstumsfaktoren behandelt und stellte die Versuchsgruppe dar. Die andere Hälfte, ohne weitere Zusätze zum Kulturmedium, diente als Kontrollgruppe. Somit standen pro Patient jeweils zwei bis vier Vliese der Versuchs- und der Kontrollgruppe zur Verfügung, welche zu den genannten Messzeitpunkten verwertet wurden. Waren von einem Patienten genug Zellen vorhanden, wurden weitere Vliese als Reserve hergestellt, um mögliche Resorptionen kompensieren, oder Material zur Herstellung von Gefrierschnitten verwenden zu können. Eine Zusammenfassung aller hergestellten Vliese zeigt Tabelle 1.

Insgesamt wurden jeweils 17 Vliese der Versuchs- und der Kontrollgruppe nach der stationären Phase untersucht und je 44 Vliese beider Gruppen in Nacktmäuse implantiert.

		Versuchsgruppe mit Wachstumsfaktoren			Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktoren			
<b>Standard PDS-Anteil</b>	Zeit in vivo	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>n=68</b>
	Biochemie	10	10	10	10	10	10	
	Reserve	4			4			
	Insgesamt	n=34			n=34			
<b>Reduzierter PDS-Anteil</b>	Zeit in vivo	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>n=54</b>
	Biochemie	7	8	8	7	8	8	
	Reserve	4			4			
	Insgesamt	n=27			n=27			
		<b>n=61</b>			<b>n=61</b>			<b>n=122</b>

Tabelle 1

## **2.8 Quantifizierung des Einflusses der Wachstumsfaktoren**

### **2.8.1 Gewicht**

Nach Erreichen von Raumtemperatur wurden die Vliese nochmalig mit Kompressen von eventuellem Kondenswasser befreit und mit einer handelsüblichen Feinwaage (Sartorius 1264 MP, Göttingen, D / Mettler AC88 Deltarange, Giessen, CH) gewogen. Direkt im Anschluss wurden die folgenden biochemischen Untersuchungen durchgeführt.

### **2.8.2 Biochemische Verfahren**

#### **2.8.2.1 Papainverdau**

Zur Durchführung der biochemischen Analysen wurden die Vliese mit der Sulfhydrylprotease Papain Type III (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) verdaut. Zunächst wurde ein 0,1 molarer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Darmstadt, D) Puffer mit 0,01 molarem EDTA (Merck, Darmstadt, D) angesetzt und unter pH-Meter Kontrolle auf pH 6,0 eingestellt. Diese Pufferlösung wurde mit einem Zellulose-Acetatfilter der Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$  unter einem Laminar Flow (LaminAir HLB 2448 GS, Heraeus Christ GmbH, Osterode, D) steril filtriert. Entnahmen aus dieser Stocklösung wurden nur mit sterilen Pipettenspitzen unter einem Laminar Flow durchgeführt. Mit diesem Puffer wurde eine 0,01 molare Cystein-HCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) hergestellt und anschließend 0,125 mg/ml Papain Type III (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) darin gelöst. Diese Verdaulösung wurde immer sofort verbraucht. Die Konstrukte wurden mit einer chirurgischen Schere in einem Eppendorffhütchen zerkleinert und zügig mit der Verdaulösung bei 60 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min bei 10000 upm zentrifugiert und der Überstand bei 4 °C bis zur Durchführung der biochemischen Analysen gelagert.

#### **2.8.2.2 Quantifizierung der Glykosaminoglykane**

Zum quantitativen Nachweis von sulfatierten Glykosaminoglykanen, die eine entscheidende Komponente hyalinen Knorpels darstellen, wurde der Papainverdau mit 1,9-Dimethylmethylenblau (Merck, Darmstadt, D) versetzt und in Anlehnung an Veröffentlichungen von Farndale [30, 31] photometrisch gegen eine Standardreihe aus Chondroitinsulfat C (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) gemessen. 16 mg 1,9-Dimethylmethylen Blau (DMB) wurden in 5 ml Ethanol unter Rühren gelöst. Ein

Puffer aus 0,04 molarem NaCl und 0,04 molarem Glycin wurde auf pH 3 eingestellt und die DMB-Farblösung damit auf einen Liter aufgefüllt. Diese Gebrauchslösung wurde in einer braunen Glasflasche bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine Stocklösung der Konzentration 1 mg/ml Chondroitinsulfat C (Sigma-Aldrich, Steinheim, D), wurde in einem Puffer aus 0,1 molarem  $\text{N}_2\text{HPO}_4$  und 0,01 molarem  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  bei pH 7,4 gelöst. Hieraus wurde eine absteigende Standardverdünnungsreihe der Konzentrationen 500  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , 31,3  $\mu\text{g/ml}$ , 15,6  $\mu\text{g/ml}$ , 7,8  $\mu\text{g/ml}$  sowie einem Leerwert hergestellt. 1 ml des Nachweisreagenz wurde mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  Probe oder Standardverdünnung gemischt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Nalge Nunc Int., DK) platziert (jeweils 200  $\mu\text{l}$ ). Der GAG-Gehalt wurde durch die Bestimmung der Extinktion der einsetzenden Farbreaktion mittels eines automatischen Photometers (Elx 800 Universal Microplate Reader, BioTek Instruments, INC., Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert. Alle Extinktionen wurden vierfach bestimmt.

### **2.8.2.3 Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts**

Hydroxyprolin stellt eine wichtige Komponente des fibrillären Kollagens dar und entsteht ausschließlich nach Einbau von Prolin in die Primärstruktur der Kollagenkette durch enzymatische Hydroxylierung [74]. Somit kann Hydroxyprolin zur Bestimmung des Kollagengehalts eines Gewebes herangezogen werden. Die verwendeten Methoden beziehen sich auf Woessner und Stegemann [126, 151].

Jeweils 50 und 100  $\mu\text{l}$  des Papainverdaus wurden mit 6 molarer HCl (Merck, Darmstadt, D) in einer Glasampulle auf einen Milliliter aufgefüllt und luftdicht verschlossen. Die Proben wurden anschließend für 24 h bei 110 °C in einem Heizofen hydrolysiert. Im Folgenden wurde die Salzsäure durch Verdampfen bei 110 °C für 24 h aus dem Hydrolysat entfernt. Ein Citrat-/Acetat-Puffer (238 mM Citrat, 192 mM Eisessig, 882 mM Natrium Acetat, 850 mM NaOH und 5 Tropfen Toluol auf 500 ml Puffer) mit pH 6, wurde im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und zum Auffüllen der Proben auf 1 ml verwendet. Hydroxyprolin (Merck, Darmstadt, D) wurde in der Konzentration 0,1 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst, und zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe benutzt. Diese Lösung wurde mit verdünntem Citrat-/Acetat-Puffer gemischt und so Standards der Konzentrationen 1 bis 5  $\mu\text{g/ml}$  angesetzt. Sowohl zu den Proben als auch den Standards wurde 0,5 ml Chloramin T Lösung (0,705 g Chloramin T (Merck, Darmstadt, D) in 40 ml unverdünntem Citrat-/Acetat-Puffer und 5 ml Isopropanol) zugegeben und die Mischung bei

Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde den Proben 0,5 ml eine 1 molare Lösung des Nachweisreagenz p-Aminodimethylbenzaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in Isopropanol und 1,55 molarer Perchlorsäure (60 %) (Merck, Darmstadt, D) zugesetzt. In dieser Mischung setzte nach 15 min im Wasserbad bei 60 °C eine Farbreaktion ein. Anschließend wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser in ca. 5 min auf Umgebungstemperatur heruntergekühlt und in Mikrotiterplatten verteilt. Mittels eines automatischen Photometers (Elx 800 Universal Microplate Reader, BioTek Instruments, INC., Winooski, USA) wurde die Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert. Alle Extinktionen wurden vierfach bestimmt.

#### **2.8.2.4 Bestimmung des DNA-Gehaltes**

Nach Kim und Mitarbeitern kann mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33258 die Zellularität eines Konstruktes indirekt, über die Messung der Gesamt-DNA, bestimmt werden. Der DNA-Gehalt eines Chondrozyten wurde mit 7,7 pg veranschlagt [70].

Der Bisbenzimidazol-Farbstoff Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem TEN-Puffer (Tris, EDTA, NaCl) gelöst. TEN-Puffer ist eine 0,01 molare Lösung von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S) mit 0,001 molarem Na<sub>2</sub>EDTA (Merck, Darmstadt, D) und 0,1 molarem NaCl (Merck, Darmstadt, D) bei pH 7,4. Diese Lösung wurde in einem Polypropylen-Röhrchen bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Kalbsthymus-DNA (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1 molarem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, D) und 0,01 molarem Na<sub>2</sub>EDTA bei pH 7,4 gelöst und zur Erstellung einer Standardverdünnungsreihe verwendet. Es wurden Verdünnungen von 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml hergestellt. Zur Durchführung der fluoreszenzphotometrischen Messung wurde aus der Hoechst 33258/TEN-Pufferlösung eine Gebrauchsverdünnung von 0,1 µg/ml in TEN-Puffer hergestellt. Jeweils 50 µl der Proben bzw. der Standardverdünnung Kalbsthymus-DNA wurden mit 2 ml Farbstoffgebrauchsverdünnung gemischt. 200 µl Portionen dieser Mischung wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Labsystems Oy, Helsinki, Fin), eingebracht und in einem automatischen Fluoreszenzspektrometer (Victor<sup>2</sup>, Wallac 1420, Wallac Inc., Gaithersburg, MD, USA) ausgewertet. Die Exzitationswellenlänge betrug hierbei 358 nm und die Emission wurde bei 458 nm gemessen. Alle Emissionen wurden vierfach bestimmt.

## **2.9 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Mehrere Vliese wurden zur Anfertigung von Gefrierschnitten verwendet. Dazu wurden sie in O.C.T. Compound (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff konserviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -30 °C aufbewahrt. Mit einem Mikrotom (Leica CM 1900, Leica Microsystems Nussloch, Nussloch, D) wurden Serien von 5 µm dicken Schnitten angefertigt und auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen. Nach Lufttrocknung über Nacht wurden die Proben für 10 min mit Aceton fixiert und zur weiteren Behandlung bei -30 °C gelagert.

### **2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Schnitte aller Konstrukte wurden zur Beurteilung der Morphologie mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

Nach Erreichen von Raumtemperatur durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe, bevor sie für sechs Minuten in Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt, D) getaucht wurden. Anschließend wurden die Objektträger für zehn Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte für drei Minuten die Anfärbung mit Eosin (Apotheke Klinikum Innenstadt, München, D). Nun wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe sowie Xylol (Merck, Darmstadt, D) entwässert. Die endgültige Einbettung erfolgte mittels Eukitt (Kindler, Freiburg, D).

## 2.10 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Daten als Median  $\pm$  SEM dargestellt.

Bei der statistischen Auswertung der Veränderungen der gemessenen Parameter über die Zeit in den betrachteten Gruppen, kam der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zum Einsatz.

Bei der Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen der Entwicklung der Parameter über die Zeit in der Versuchs- oder Kontrollgruppe, wurde der U-Test nach Mann-Whitney für unverbundene Stichproben eingesetzt.

Da bei den verwendeten Verfahren multiple Tests an den erhobenen Daten durchgeführt wurden, musste zur Korrektur des Signifikanzniveaus das Verfahren nach Bonferroni-Holm verwendet werden.

Um Unterschiede zwischen den Konstrukten auf den beiden Vliestypen zu überprüfen, wurde der exakte Test nach Fisher benutzt.

Statistische Signifikanz wurde jeweils bei p-Werten  $< 0,05$  angenommen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Knorpelisolierung und Monolayer-Kultur**

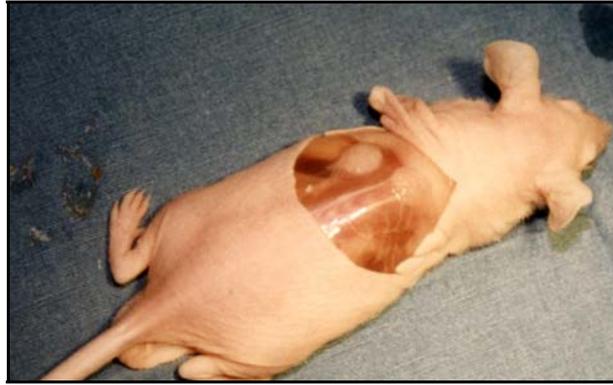
Die Zerkleinerung des verarbeiteten Knorpels und die Gewinnung von Einzelzellen war sicher reproduzierbar durchzuführen. Die Chondrozyten tolerierten die Isolierung gut, was mit der Trypanblau-Methode gezeigt werden konnte. Die Knorpelproben wogen durchschnittlich  $0,85 \pm 0,08$  g und enthielten  $3,3 \times 10^6$  Zellen. In Monolayer kam es zu räumlich homogener Proliferation, so dass der Boden der Zellkulturflasche vollständig von Zellen bedeckt war. Ein Wachstum in mehreren Schichten wurde nicht beobachtet. Nach abgeschlossener Expansion konnte die Zellzahl fast um den Faktor 20 erhöht werden. Damit standen zum Aussäen in die 3-D-Kultur im Durchschnitt über  $50 \times 10^6$  Zellen pro Patient zur Verfügung. Wie schon von anderen Autoren beschrieben [6, 51, 147], verloren die Zellen in Monolayer nach wenigen Tagen ihre ursprünglich runde Morphe und imponierten nun als polygon-langgestreckte Zellen. Die Form der Zellen steht in engem Zusammenhang mit der Ausprägung knorpelspezifischer Synthesefunktionen [51, 147]. Der Verlust dieser Fähigkeiten wird als Dedifferenzierung bezeichnet, ist aber reversibel sobald Knorpelzellen in einer 3-D-Kultur eingesetzt werden und wieder ihre ursprüngliche sphärische Konfiguration annehmen können [6].

### **3.2 3-D-Kultur**

Nach  $15 \pm 0,47$  Tagen in Monolayer-Kultur wurden die Zellen auf Ethisorb-Vliese übertragen. Die Zellsuspension wurde ohne zusätzliche Manipulation an den Trägermaterialien von sämtlichen Vliesen durch Kapillarwirkung vollständig aufgenommen. Lichtmikroskopische Kontrolle zeigte eine gleichmäßige Besiedelung der sichtbaren Vliestteile mit Chondrozyten.

### **3.3 Tiermodell**

Narkose und Eingriff wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Auch im weiteren Verlauf des Versuchs traten weder Infektionen noch andere Komplikationen auf. Von 34 eingesetzten Mäusen verstarb nur eine vorzeitig.



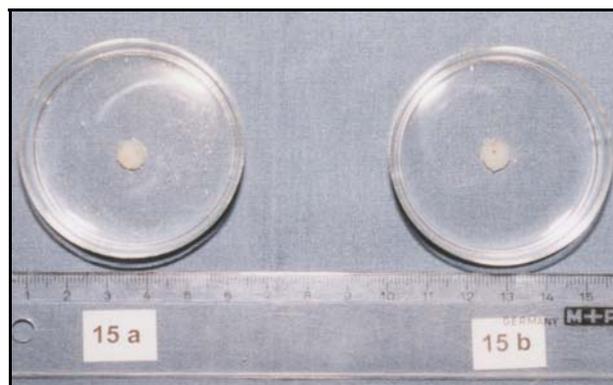
**Abbildung 6**

Konstrukte nach 12 Wochen in vivo. Die Vliese zeigten keinerlei Verwachsungen mit der Haut und ließen sich problemlos aus der Maus extrahieren.

### 3.4 Morphologie der Vliese

#### 3.4.1 Makroskopische Morphe und Resorptionsverhalten in vivo

Sämtliche Vliese waren nach der stationären 3-D-Kultur formstabil und leicht zu handhaben. Makroskopisch war kein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe festzustellen. Die faserige Konsistenz des Trägermaterials dominierte den äußeren Aspekt. Zerfallserscheinungen waren nicht zu erkennen. Die Implantation war bei allen Präparaten problemlos möglich. Im Verlauf der in vivo Phase des Experiments, zeigten die Vliese aber deutlich unterschiedliche äußere Aspekte.



**Abbildung 7**

Explantate nach 12 Wochen im Versuchstier. Die Konstrukte mit Standard Gehalt an PDS sind formstabil und weisen eine schimmernd-weiße Oberfläche auf.

Nach vier Wochen in der Nacktmaus konnten Vliese mit Zellen von 15 Patienten explantiert werden. Zell-Copolymer-Konstrukte von zwei Patienten waren vollständig resorbiert und nicht mehr erkennbar.

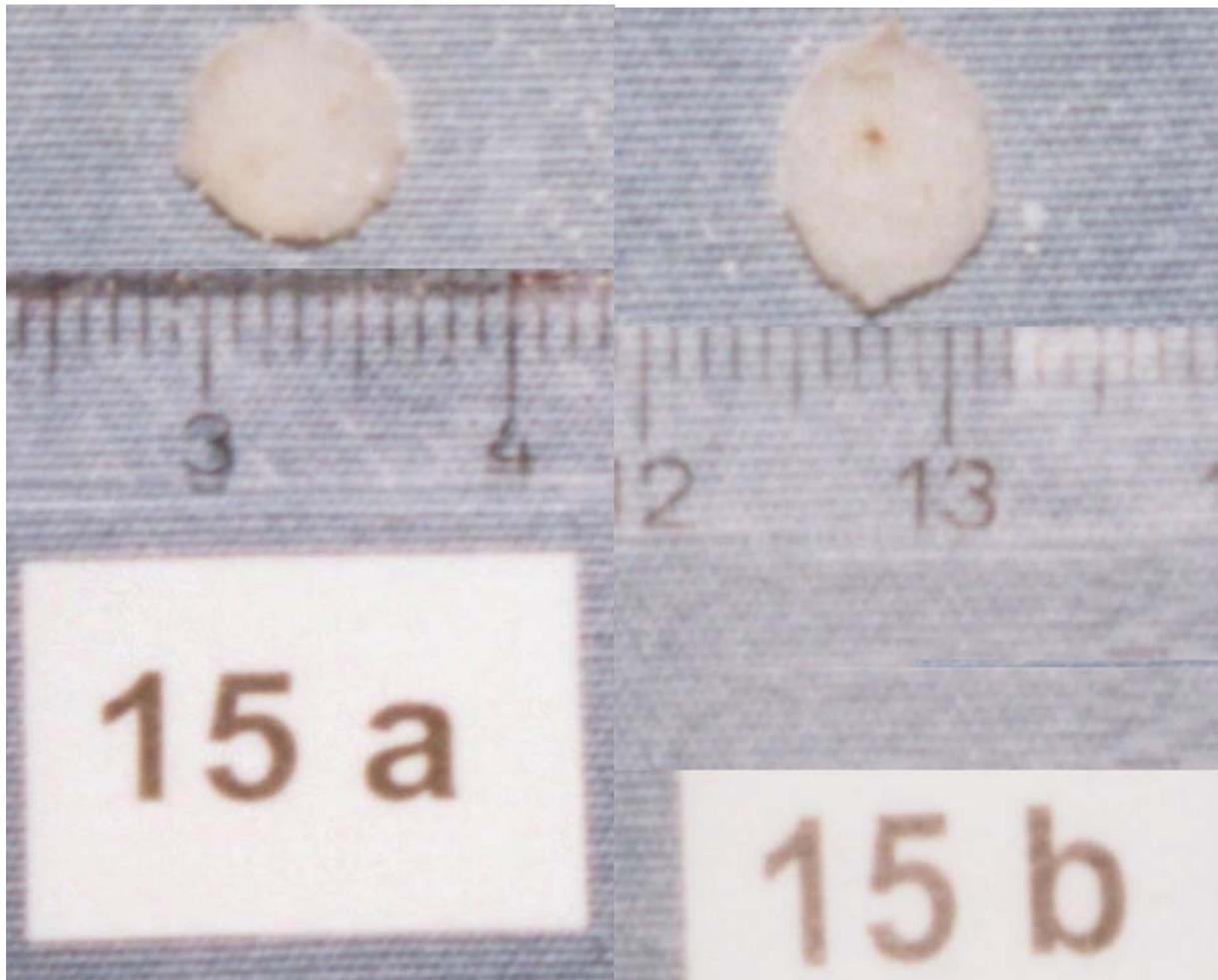
28 der insgesamt 36 explantierten Vliese waren dem äußeren Anschein nach weißlich durchschimmernd und fest-elastisch. Die Vliese waren in der Regel im Vergleich zum Implantationszeitpunkt etwas geschrumpft, hatten aber ihre zylindrische Ausgangsform beibehalten. Acht Vliese zeigten jedoch deutliche Resorptionserscheinungen, waren gallertig-weich und wenig formstabil.

Die zur Verfügung stehenden Vliese von 15 Patienten wurden gewogen und biochemisch untersucht. Von drei dieser Patienten waren zusätzliche Vliese zur Anfertigung von Gefrierschnitten vorhanden. Eine Unterscheidung zwischen Vliesen der Versuchs- und Kontrollgruppe war makroskopisch zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Ein deutlicher Unterschied war jedoch zwischen den verwendeten Vliestypen (Standard PDS-Gehalt vs. reduzierter PDS-Gehalt) festzustellen. Alle 20 Vliese mit Standard PDS-Gehalt erschienen stabil und knorpelartig hyalin. Sie konnten sämtlich ohne Probleme aus dem Versuchstier explantiert werden. Im Gegensatz dazu waren von den 16 Vliesen mit reduziertem PDS-Anteil nur vier stabil und knorpelartig hyalin während die verbleibenden acht Konstrukte stark degradiert waren und deutlichen Form- und Strukturverlust aufwiesen. Zusätzlich enthielten auch die vollständig resorbierten Vliese einen reduzierten Anteil an PDS.

Nach 3 Monaten in der Nacktmaus konnten ebenfalls Vliese mit Zellen von 15 Patienten bei der Explantation identifiziert werden. Von zwei Patienten waren die Zell-Copolymer-Konstrukte vollständig resorbiert und waren einer weiteren Untersuchung nicht mehr zugänglich. Zwei weitere Vliese gingen der Untersuchung verloren, da das Versuchstier verstorben war.

Für die quantitativen Analysen stand von 15 Patienten je ein Vlies der Kontroll- und der Versuchsgruppe zur Verfügung. So konnten je 15 Vliese der entsprechenden Gruppe gewogen und biochemisch untersucht werden. Von vier dieser 15 Patienten lagen zusätzliche Vliese vor, die der Anfertigung von Gefrierschnitten dienten. Insgesamt konnten zu diesem Zeitpunkt 38 Vliese (19 aus der Versuchs- und 19 aus der Kontrollgruppe) aus dem Versuchstier gewonnen werden. Davon wiesen 24 Konstrukte eine weißlich durchschimmernde Konsistenz auf und erinnerten deutlich an Knorpelgewebe. 14 Vliese zeigten ausgeprägte Resorptionserscheinungen und Formverluste. Wieder konnten Vliese der Kontrollgruppe makroskopisch nicht von Vliesen der Versuchsgruppe unterschieden werden.



**Abbildung 8**

Vergrößerte Darstellung aus Abbildung 7. Die weißlich-schimmernde Oberfläche ist hier besser zu erkennen. Das Vlies stammt aus der Versuchsgruppe.

**Abbildung 9**

Vergrößerte Darstellung aus Abbildung 7. Das Vlies aus der Kontrollgruppe zeigt makroskopisch keinen Unterschied zum Vlies der Versuchsgruppe.

Zwölf Wochen nach der Implantation waren jedoch erhebliche Unterschiede zwischen Konstrukten mit Standard bzw. reduziertem PDS-Anteil zu erkennen. Alle 28 eingesetzten Vliese mit Standard PDS-Gehalt konnten problemlos erkannt und aus der Maus explantiert werden. 22 Konstrukte zeigten einen weißlich-durchschimmernden äußeren Aspekt und nur sechs wiesen deutliche Resorptionserscheinungen auf. Im Gegensatz dazu waren von den 20 eingesetzten Vliesen mit reduziertem PDS-Gehalt nur noch zehn in der Maus wiederzuerkennen. Mit Ausnahme zweier Konstrukte, zeigten alle starke Zerfallserscheinungen. Die Vliese waren deutlich geschrumpft und amorph-weich. Acht Vliese waren völlig resorbiert und konnten nicht weiter untersucht werden. Zwei weitere PDS-reduzierte Vliese gingen verloren, als das Versuchstier verstarb.

Betrachtet man die reine Resorptionsrate der Konstrukte, zeigt sich, dass Vliese mit reduziertem Anteil an PDS in vivo deutlich häufiger resorbiert wurden als Vliese mit Standard PDS Anteil (Tabelle 2). Nach 4 Wochen ist eine entsprechende Tendenz schon zu erahnen, diese wird aber erst nach Implantation für 12 Wochen signifikant ( $p < 0.001$ ).

Die folgende Tabelle fasst den Verbleib aller Vliese zusammen.

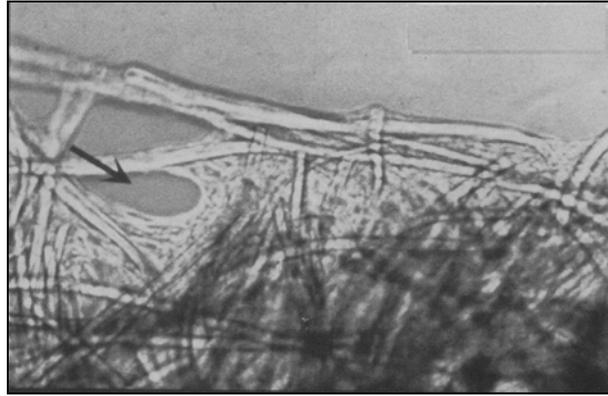
		Versuchsgruppe mit Wachstumsfaktoren			Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktoren			
Standard PDS-Anteil	Zeit in vivo	0	4	12	0	4	12	n=68
	Biochemie	10	9	11	10	9	11	
resorbiert	0	0	0	0	0	0		
Schnitte	0	1	3	0	1	3		
verloren	0	0	0	0	0	0		
Insgesamt	n=34			n=34				
Reduzierter PDS-Anteil	Zeit in vivo	0	4	12	0	4	12	n=54
	Biochemie	7	6	4	7	6	4	
	resorbiert	0	2	4*	0	2	4*	
	Schnitte	0	2	1	0	2	1	
	verloren	0	0	1	0	0	1	
	Insgesamt	n=27			n=27			
		n=61			n=61			n=122

\*Signifikant von Vliesen mit Standard PDS-Anteil verschieden,  $p < 0,001$

Tabelle 2

### 3.4.2 Mikroskopische Morphe

Unter dem Lichtmikroskop war die in Monolayer-Kultur gesehene, polygone Form der Zellen nach der Übertragung auf die Trägervliese nicht mehr zu erkennen. Die Zellen zeigten flächige bis runde Morphologie und Adhärenz an die Fasern der Copolymere. Die Zellen waren in allen sichtbaren Arealen des Vlieses gleichmäßig verteilt und zum Teil zwischen benachbarten Fasern regelrecht „aufgespannt“ (Abb. 10).



**Abbildung 10**

Die Zellen liegen „aufgespannt“ zwischen den Vliesfasern. Aufnahme nach 10 Tagen in 3-D-Kultur. Vergrößerung 200 x.

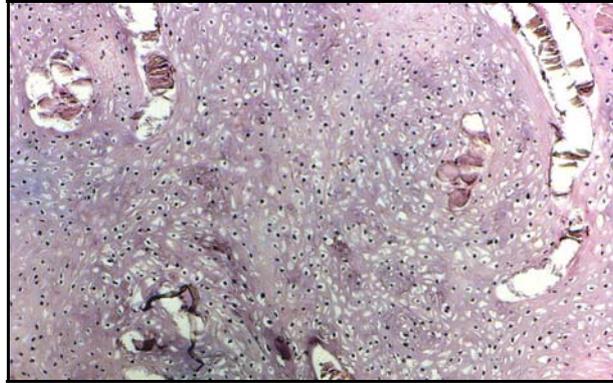
Einige Zellen wurden jedoch nach dem Beimpfen von den Trägermaterialien nicht adhären, fielen ab und proliferierten nun auf dem Boden der Multiwell-Kulturplatte in Monolayer. Bei den entsprechenden Präparaten wurden die Zell-Polymerkonstrukte zügig in frische Kulturplatten übertragen, um wieder eine reine 3-D-Kultur zu erreichen.

Nach der in vivo Phase wurden von insgesamt 14 Konstrukten (8 auf Vliesen mit Standard PDS und 6 auf PDS-reduzierten Vliesen), nach entsprechender Einbettung Gefrierschnitte hergestellt. Von der Explantation bis zur Einbettung lagerten die Präparate über anderthalb Jahre bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Von den 8 Vliesen mit Standard PDS-Gehalt lieferten 7 Präparate brauchbare Schnitte, während von 6 PDS-reduzierten Vliesen nur mehr 2 mikroskopisch verwertbar waren. Nach Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Präparate zunächst mit Hämatoxylin-Eosin in Übersicht dargestellt.

#### **3.4.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

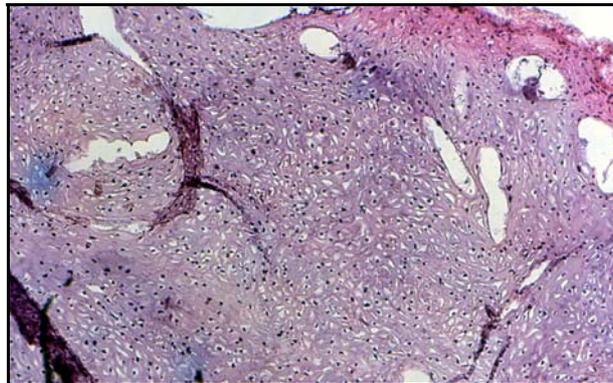
Allen Präparaten gemeinsam war eine unterschiedlich starke, bindegewebige Kapsel aus mehreren Lagen langgestreckter Zellen. Die Konstrukte enthielten nach 4 Wochen in vivo Reste der PGA-PLA-Copolymer-Fasern und der PDS-Schmelzen. Nach 12 Wochen in der Nacktmaus waren nur noch PDS-Reste zu erkennen. Bereiche in denen sich die Copolymer-Fasern befunden hatten, waren noch nicht mit Matrix aufgefüllt (Abb. 11, 14 und 15). Die Vliesbestandteile zeigten zu beiden Zeitpunkten deutliche Querrisse und Resorptionserscheinungen. Im Zentrum der gefärbten Präparate konnten oval-runde Zellen in polygon bis runden Lakunen erkannt werden, welche in einer teilweise metachromatischen Interzellulärschubstanz eingebettet waren (Abb. 11 mit 14). In Konstrukten von zwei Patienten zeigte sich ein

zellreiches Gewebe aus langgestreckten Zellen ohne Lakunen oder Ablagerungen knorpelartiger extrazellulärer Matrix (Abb. 15). Die mikroskopische Betrachtung der Präparate erbrachte keine augenfälligen Unterschiede zwischen Konstrukten der Kontroll- und der Versuchsgruppe (Abb. 11 und 12).



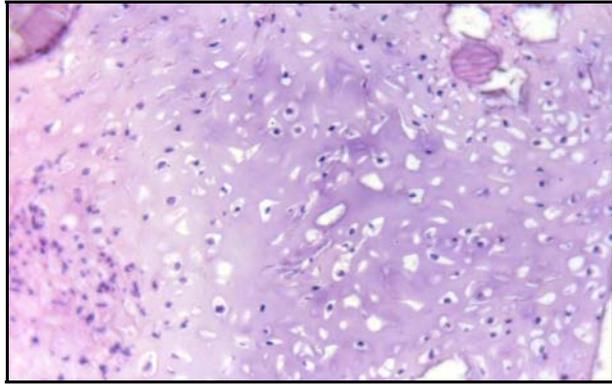
**Abbildung 11**

Knorpelähnliches Gewebe in einem Konstrukt der Versuchsgruppe nach 12 Wochen in vivo. Gut zu erkennen sind die gleichmäßig verteilten Zellen, eingebettet in teilweise metachromatischer extrazellulärer Matrix. PDS-Reste mit deutlichen Querrissen sind erkennbar. Blutgefäße oder Verkalkungen konnten in keinem Präparat dargestellt werden. H.-E.-Färbung, Vergrößerung 100 x.



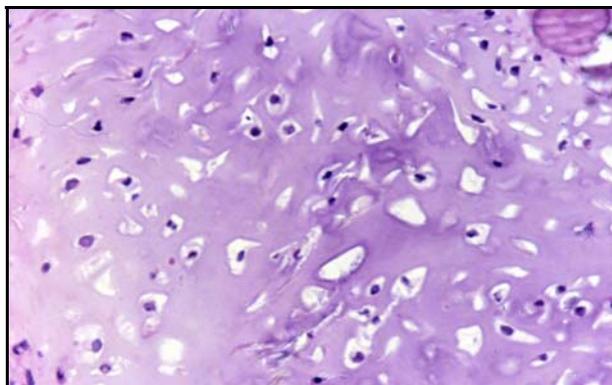
**Abbildung 12**

Konstrukt der Kontrollgruppe nach 12 Wochen in vivo, mit Zellen des gleichen Patienten wie in Abb. 11. Die Verteilung der Zellen und die Matrixdeposition ähnelt dem entsprechenden Vlies der Versuchsgruppe (vgl. Abb.11). H.-E.-Färbung, Vergrößerung 100 x.



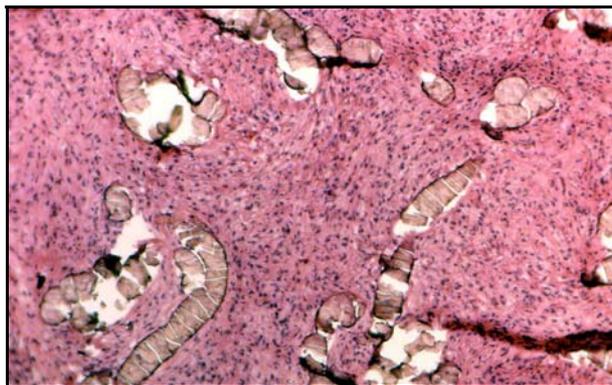
**Abbildung 13**

Vlies der Versuchsgruppe nach 12 Wochen in vivo. Die Zellen liegen in Lakunen metachromatischer extrazellulärer Matrix.  
H.-E.-Färbung, Vergrößerung 200 x.



**Abbildung 14**

Vergrößerte Darstellung aus Abb. 13. Die extrazelluläre Matrix ist gleichmäßig im Bildausschnitt verteilt. Fasern können darin nicht erkannt werden. PDS-Reste sind in der oberen rechten Ecke zu erkennen. H.-E.-Färbung, Vergrößerung 320 x.



**Abbildung 15**

Nach 4 Wochen in vivo war in je zwei Vliesen der Kontroll- und der Versuchsgruppe ein zellreiches Gewebe ohne Lakunen oder knorpelartiger extrazellulärer Matrix zu erkennen. H.-E.-Färbung, Vergrößerung 100 x.

### 3.5 Gewichte und biochemische Methoden

Insgesamt wurden 94 Vliese den quantitativen Untersuchungen zugeführt (Tabelle 2). Davon hatten 60 Konstrukte Standard PDS-Gehalt und die verbleibenden Vliese

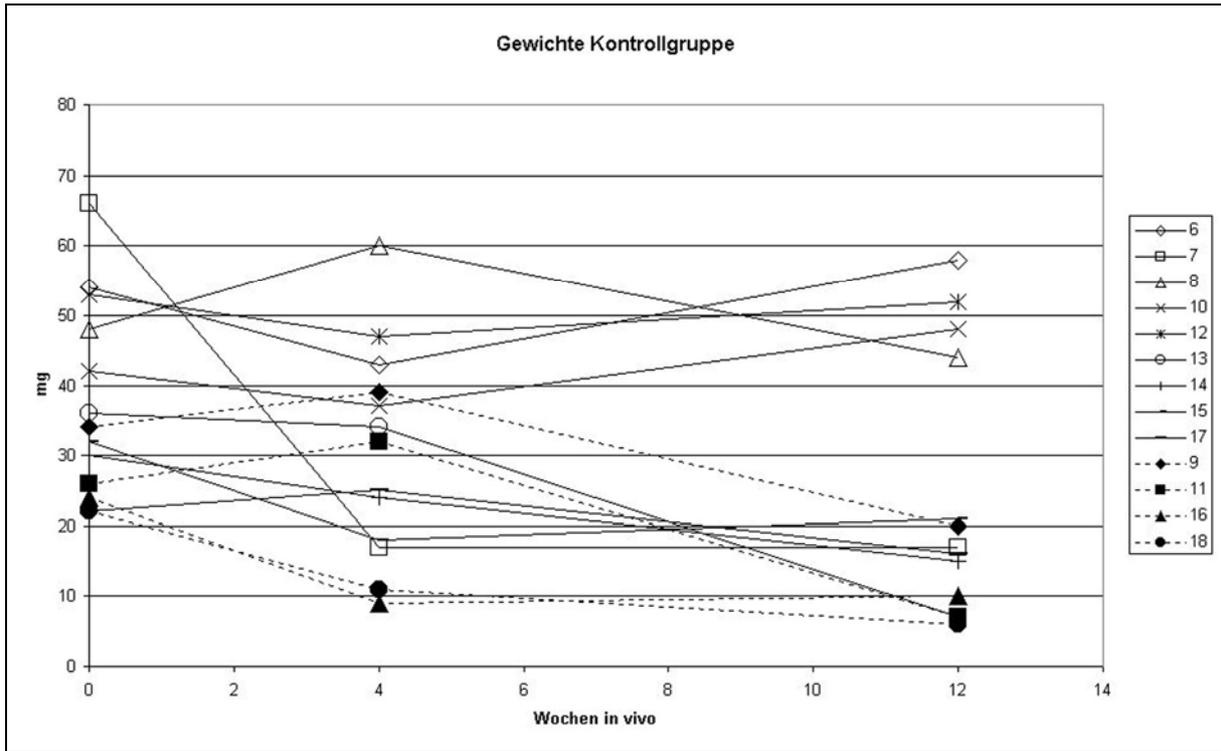
waren PDS-reduziert. Überwiegend durch Resorptionsvorgänge verringerte sich die Anzahl der zu untersuchenden Präparate. Nach der 3-D-Kultur konnten 34 Vliese (20 mit Standard PDS / 14 mit reduziertem PDS) untersucht werden, nach 4 und 12 Wochen in vivo standen nur noch 30 Vliese pro Zeitpunkt (18 Standard und 12 reduziert nach 4 Wochen sowie 22 Standard und 8 reduziert nach 12 Wochen) zur Verfügung. In die statistische Auswertung gingen nur Vliese von Patienten ein, die zu allen drei Explantationszeitpunkten untersucht werden konnten. Dies war bei Vliesen mit Chondrozyten von 13 Patienten (9 mit Standard PDS, 4 PDS reduziert) der Fall. Folglich wurden anhand von 78 Vliesen (39 aus der Kontrollgruppe und 39 aus der Versuchsgruppe) statistische Aussagen getroffen. Sofern nicht anders angegeben, beschreiben die Werte den Median  $\pm$  SEM.

Um eventuelle Einflüsse des gewählten Trägermaterials zu erkennen, wurden die Messwerte aller Parameter, zu allen Versuchszeitpunkten innerhalb der Versuchs- bzw. der Kontrollgruppe, hinsichtlich des PDS-Gehalts der Trägervliese miteinander verglichen. Aufgrund der geringen Fallzahlen sowie der resorptionsbedingten Unausgewogenheit zwischen beiden Vliestypen, konnte diesbezüglich aber keine statistische Analyse durchgeführt werden.

### **3.5.1 Gewicht**

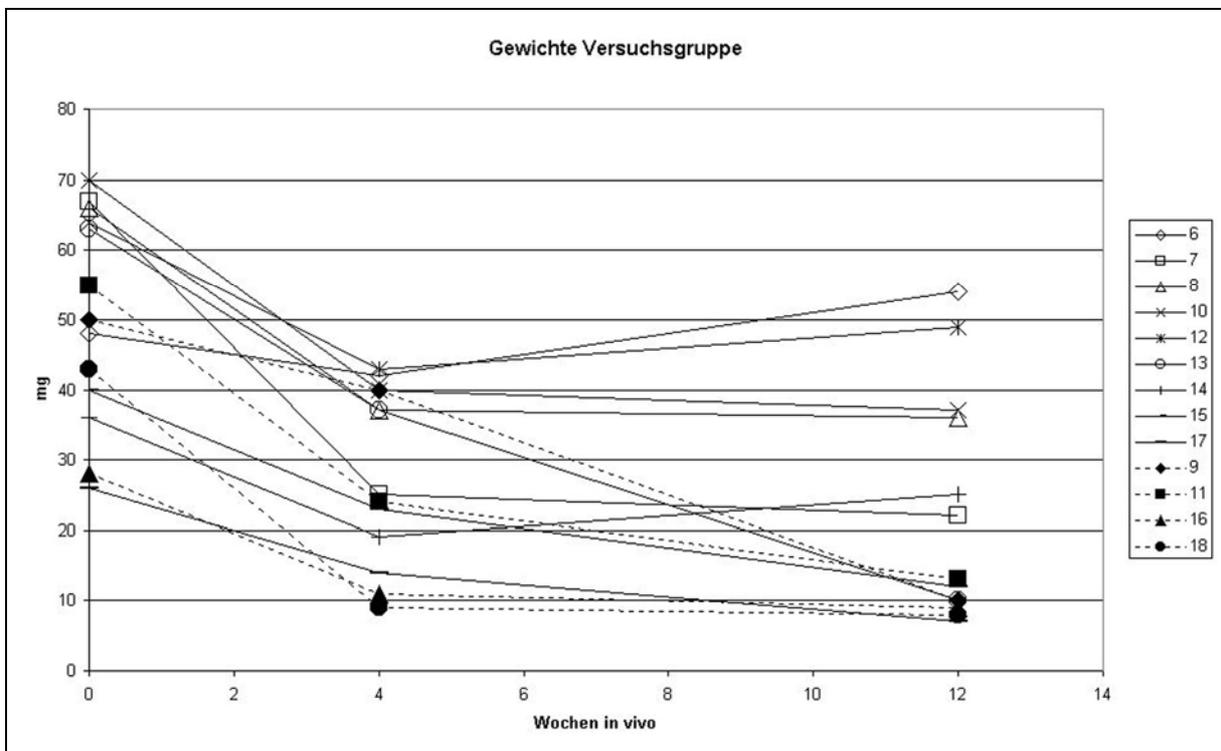
Nach Ende der stationären 3-D-Kultur waren die Vliese der Versuchsgruppe mit  $50 \pm 4,19$  mg signifikant schwerer als Vliese der Kontrollgruppe mit  $34 \pm 3,88$  mg. Im weiteren Verlauf des Experiments blieb das Gewicht der Kontrollgruppe bei  $32 \pm 4,15$  mg in etwa konstant während es in der Versuchsgruppe auf  $25 \pm 3,44$  mg fiel.

Der Gewichtsverlust zwischen diesen Zeitpunkten ist in der Versuchsgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Nach 12 Wochen in vivo wurden Konstrukte beider Gruppen leichter. In der Kontrollgruppe wogen sie  $17 \pm 5,21$  mg und in der Versuchsgruppe  $13 \pm 4,56$  mg. Trotz deutlicher Gewichtsreduktion sind die Werte weder vom Gewicht nach 4 Wochen signifikant verschieden, noch unterscheidet sich die Änderung des Gewichts in der Kontrollgruppe signifikant von der in der Versuchsgruppe. Den Gewichtsverlauf aller Vliese zeigen Abbildung 16 und 17, die statistischen Lagemaße stellt Abbildung 18 dar.



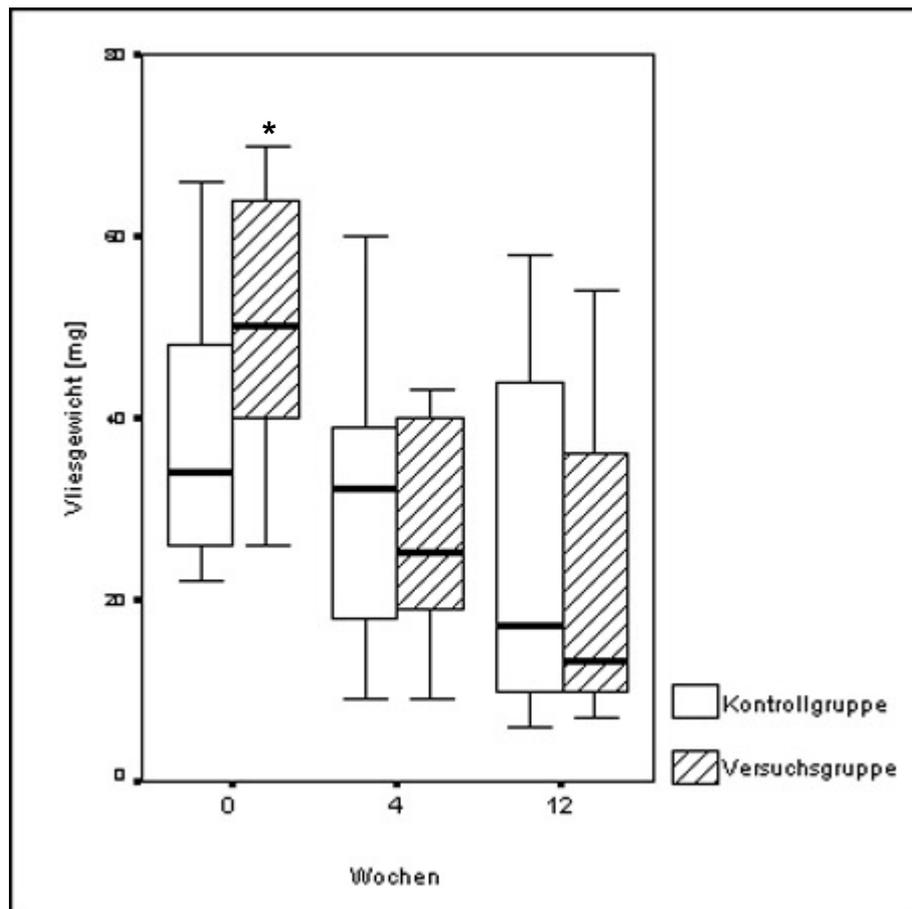
**Abbildung 16**

Konstrukte mit Zellen von 13 Patienten konnten zu allen drei Zeitpunkten für die Erhebung von quantitativen Daten herangezogen werden. Anhand dieser Daten wurden statistische Aussagen getroffen. Die Abbildung stellt den Gewichtsverlauf der Kontrollvliese nach Ende der 3-D-Kultur dar. Gestrichelte Linien bezeichnen Vliese mit reduziertem PDS-Gehalt. Deutliche interindividuelle Schwankungen sind besonders nach 12 Wochen in vivo erkennbar.



**Abbildung 17**

Gewichtsverlauf der Vliese aus der Versuchsgruppe nach 3-D-Kultur. Der Verlauf ähnelt dem der Kontrollgruppe.



**Abbildung 18**

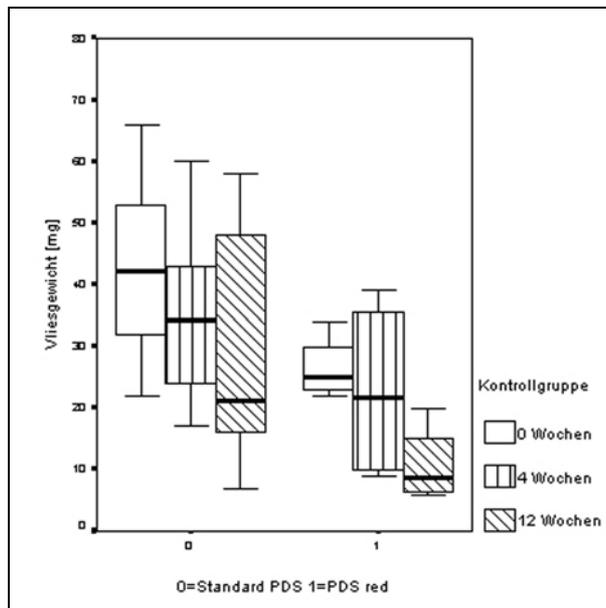
Statistische Lagemaße der Vliesgewichte zu den drei Messzeitpunkten. Durch die Boxplots sind Median, 1. und 3. Quartile sowie Minimum und Maximum repräsentiert. \*signifikant von der Kontrollgruppe verschieden,  $p < 0,05$ .

Zum Zeitpunkt 0 Wochen in vivo wurde das Gewicht der Vliese in der Kontrollgruppe hinsichtlich des PDS-Gehalts auf Unterschiede überprüft. Die Vliese mit Standard PDS wogen  $42 \pm 4,65$  mg, während PDS-reduzierte Vliese mit  $25 \pm 2,63$  mg deutlich leichter waren. Mit Übertragung in das Versuchstier verloren die Standard Vliese verhältnismäßig mehr Gewicht als Vliese mit wenig PDS und wogen nun  $34 \pm 4,8$  mg, bzw.  $21,5 \pm 7,51$  mg. Nach 12 Wochen subkutaner Implantation wogen die Standard PDS Vliese  $21 \pm 6,43$  mg, während die reduzierten Vliese mit  $8,5 \pm 3,2$  mg deutlicher Resorption ausgesetzt waren.

In der Versuchsgruppe wurden die Veränderungen der Nassgewichte ebenfalls untersucht und verhielten sich ähnlich wie in der Kontrollgruppe. Mit Wachstumsfaktoren behandelt, waren beide Vliestypen nach Ende der 3-D-Kultur, wie oben beschrieben, schwerer als entsprechende Vliese in der Kontrollgruppe. Jedoch zeigten sowohl PDS-reduzierte, als auch Vliese mit Standard PDS eine deutliche Gewichtsreduktion nach 4 Wochen in vivo. Diese setzte sich mit

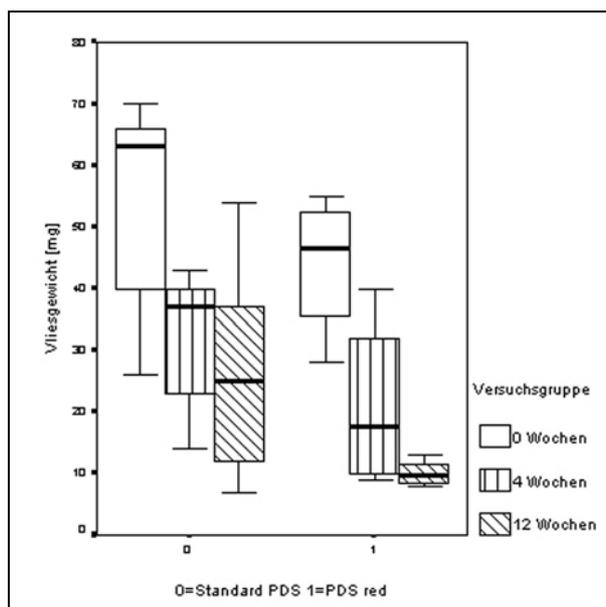
zunehmender Zeit in der Nacktmaus langsamer fort und führte nach 12 Wochen zu ähnlichen Verhältnissen wie in der Kontrollgruppe.

Absolut waren PDS-reduzierte Vliese in beiden Gruppen zu allen Zeitpunkten leichter als Konstrukte mit Standard PDS und verloren auch relativ mehr Gewicht. Die statistischen Lagemaße des Gewichtsverlaufs beider Gruppen stellen Abbildung 19 und 20 dar.



**Abbildung 19**

Statistische Lagemaße der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Vliestyp. PDS-reduzierte Vliese sind zu allen Messzeitpunkten leichter. (0 = Standard PDS, 1 = reduziertes PDS).



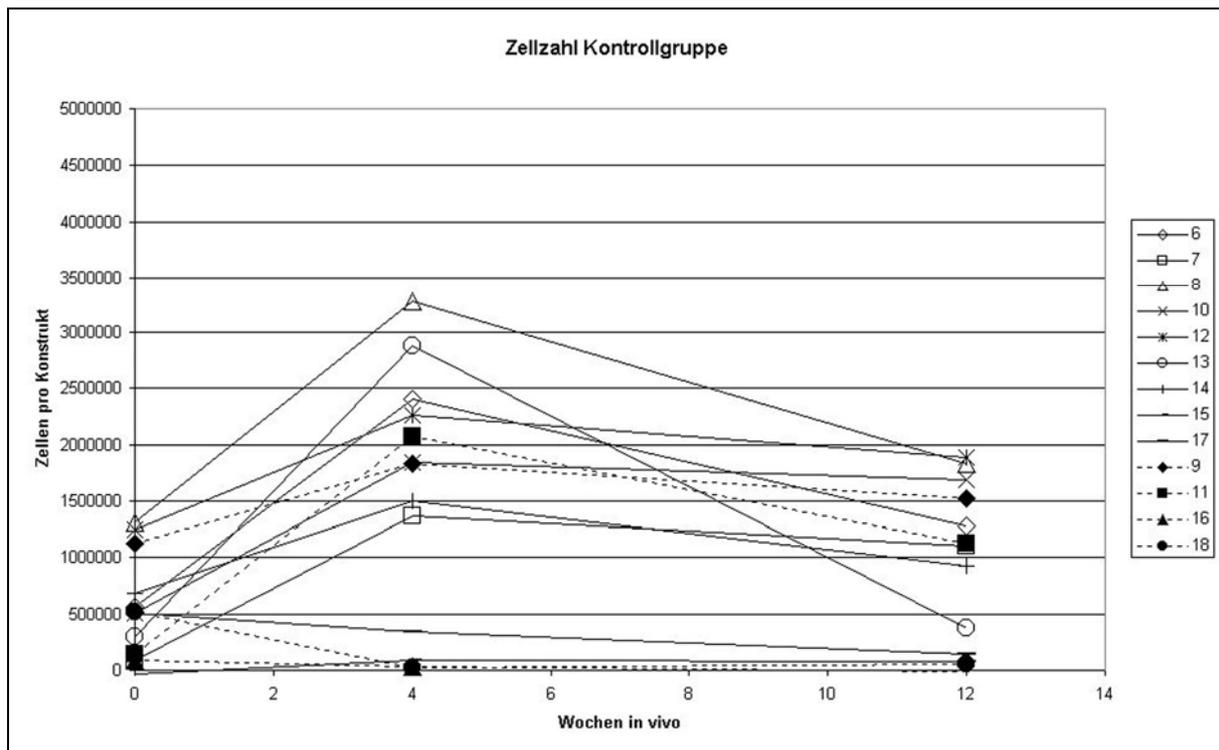
**Abbildung 20**

Statistische Lagemaße der Versuchsgruppe. Nach der 3-D-Kultur verlieren die Vliese, unabhängig vom Vliestyp, deutlich an Gewicht. PDS reduzierte Vliese sind zu allen Messzeitpunkten leichter. (0 = Standard PDS, 1 = reduziertes PDS).

## 3.5.2 Biochemische Methoden

### 3.5.2.1 Zellzahl

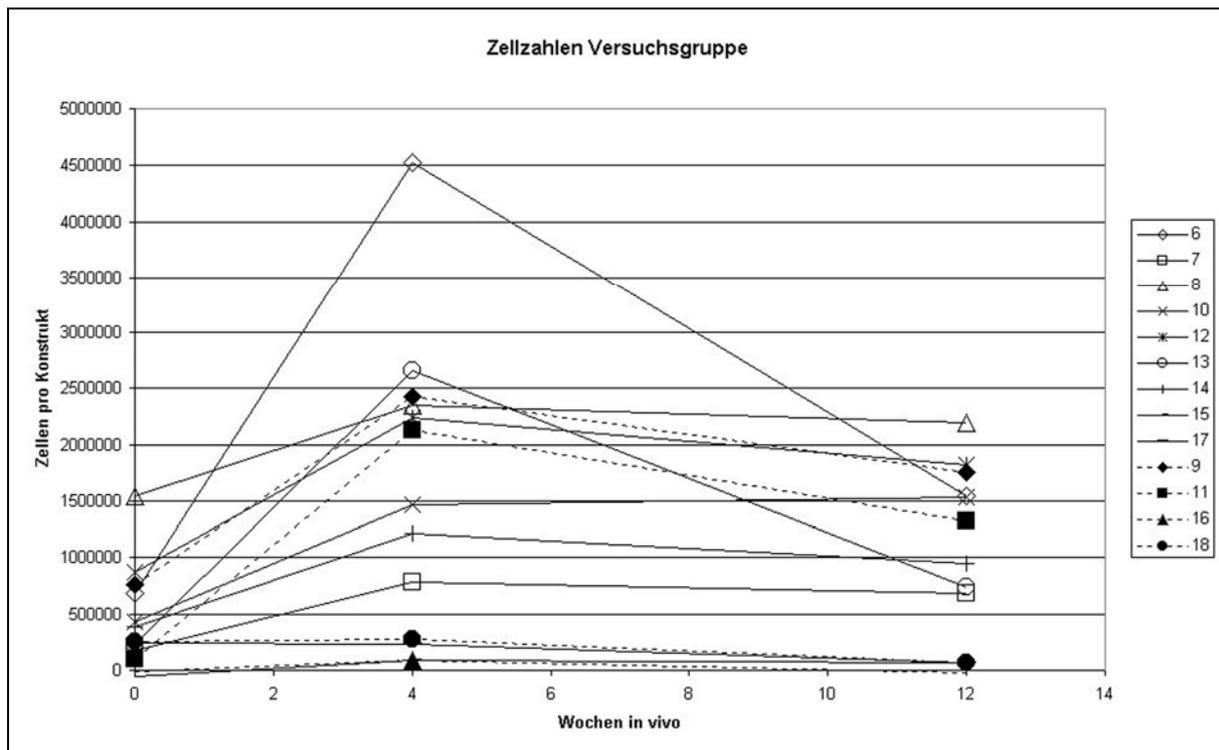
Die mit dem Hoechst 33258 Assay errechnete Zellzahl zum Ende der in vitro Phase war erheblich niedriger, als die zu Beginn der 3-D-Kultur eingesetzten  $5 \times 10^6$  Zellen pro Vlies. Der Median der Zellzahl nach 0 Wochen in vivo (= nach der 3-D-Kultur), betrug für die Kontrollgruppe  $5,04 \times 10^5 \pm 1,24 \times 10^5$  und für die Wachstumsfaktorgruppe  $2,57 \times 10^5 \pm 1,22 \times 10^5$ . Die Implantation in die Maus führte in den Kontrollvliesen zu einer Steigerung der Zellzahl auf  $1,83 \times 10^6 \pm 3,07 \times 10^5$ . Auch in den Versuchsvliesen nahm die Zellzahl im Tier auf  $1,47 \times 10^6 \pm 3,64 \times 10^5$  zu. Der Anstieg der Zellzahl in diesem Zeitraum ist sowohl innerhalb der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe signifikant. Ein Vergleich der Anstiege zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied. Nach 12 Wochen in der Maus fiel die Zahl der Zellen auf nur noch  $1,1 \times 10^6 \pm 1,98 \times 10^5$  pro Vlies in der Kontrollgruppe. Die Zellularität der Versuchsgruppe verringerte sich im selben Zeitraum auf  $9,51 \times 10^5 \pm 2,15 \times 10^5$ . Auch dieser Abfall der Zellzahl zwischen den beiden Messzeitpunkten ist in beiden Gruppen hochsignifikant, zeigt aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den betrachteten Gruppen (Abb. 21, 22 und 23).



**Abbildung 21**

Zellzahl der Kontrollgruppe. Nach Implantation in die Nacktmaus kommt es mehrheitlich zu deutlicher Zellproliferation. Nach 12 Wochen in vivo sinkt die Zellzahl, vermutlich auf Grund von Reifungsprozessen und/oder Teilresorption der Konstrukte. Gestrichelte Linien stellten PDS-reduzierte Vliese dar. Wieder sind deutliche interindividuelle Unterschiede zu beobachten.

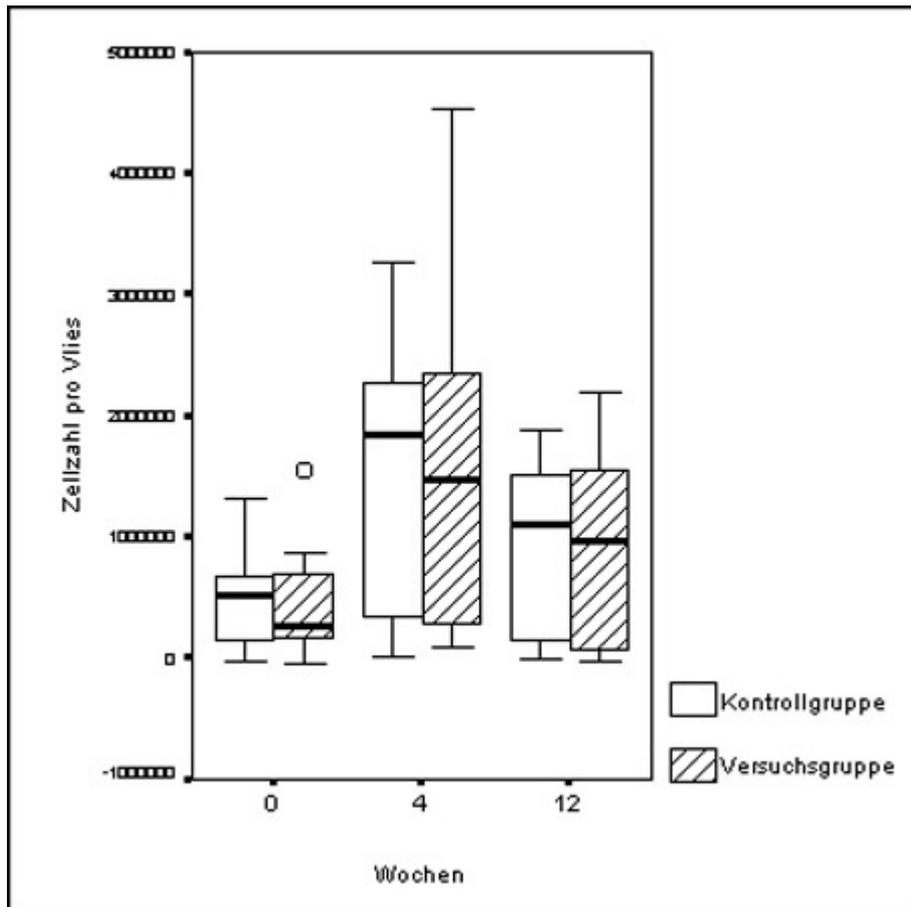
Sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe wurden die Messwerte nach PDS-Gehalt der Vliese aufgeschlüsselt betrachtet. Nach der 3-D-Kultur enthielten die Vliese mit Standard PDS-Gehalt in der Kontrollgruppe  $5,04 \times 10^5 \pm 1,54 \times 10^5$  Zellen in Vergleich zu  $3,32 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$  Zellen in PDS-reduzierten Konstrukten. Nach der Implantation stieg in Vliesen unabhängig vom PDS Gehalt die Zellkonzentration auf  $1,84 \times 10^6 \pm 3,58 \times 10^5$  in Vliesen mit Standard PDS bzw.  $9,35 \times 10^5 \pm 5,59 \times 10^5$  in PDS-reduzierten Vliesen an. Nach drei Monaten in vivo fiel die Zellzahl in beiden Vliestypen auf  $1,1 \times 10^6 \pm 3,58 \times 10^5$ , respektive  $5,88 \times 10^5 \pm 3,84 \times 10^5$  (Abb. 24).



**Abbildung 22**

Die Vliese der Versuchsgruppe zeigen zu allen Messzeitpunkten vergleichbare Zellzahlen wie die Kontrollgruppe (vgl. Abb. 21).

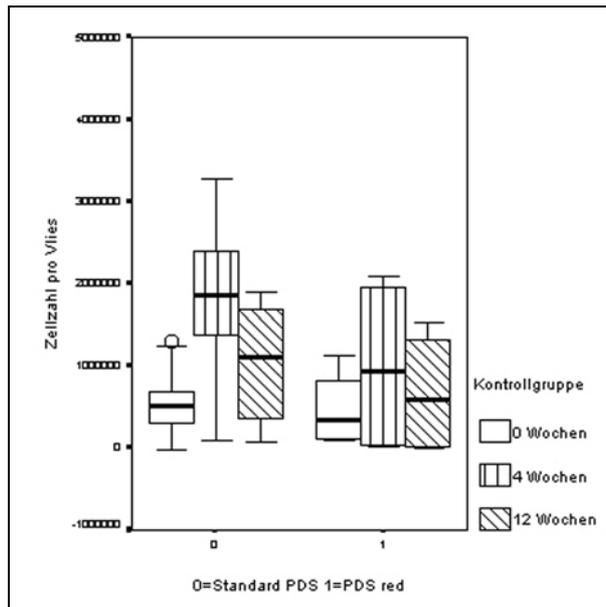
Die Versuchsgruppe zeigte einen ähnlichen Verlauf bezüglich der Zellzahl. Wieder kam es nach 4 Wochen in vivo in Standard PDS Vliesen und noch ausgeprägter in PDS-reduzierten Vliesen zu deutlicher Zunahme der Zellzahl. Im weiteren Verlauf nahm die Zellzahl zwar mit der Zeit in vivo ab, war jedoch nach 12 Wochen im Versuchstier immer noch höher als bei Implantation (Abb. 25).



**Abbildung 23**

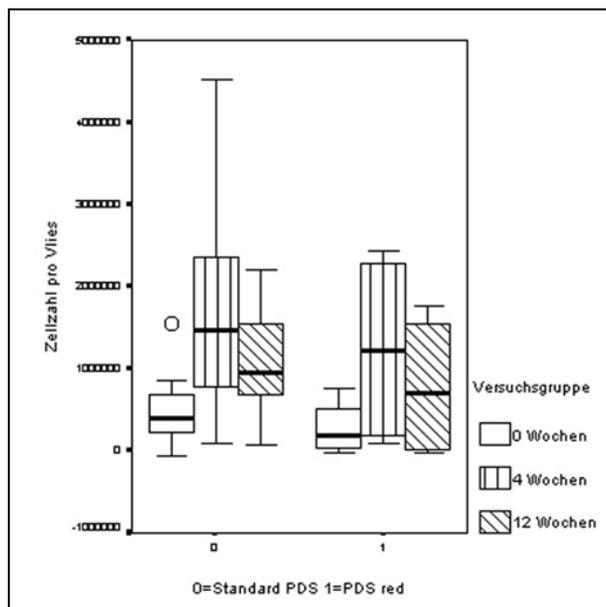
Vergleich der statistischen Lagemaße der Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Zellzahl ist zu allen Zeitpunkten ähnlich. Kreise stellen statistische Ausreißer dar (Entfernung vom Boxrand > 1,5 Boxlängen).

PDS-reduzierte Vliese wiesen in Versuchs- und Kontrollgruppe immer niedrigere absolute Zellzahlen auf. Der relative Zellverlust nach 12 Wochen in vivo war in beiden Gruppen und in beiden Vliestypen aber vergleichbar und betrug rund 40% bezogen auf die entsprechende Zellzahl nach 4 Wochen.



**Abbildung 24**

Zellzahlen der Kontrollgruppe, unterschieden nach Vliestyp. PDS-reduzierte Vliese sind zu allen Messzeitpunkten zellärmer. Kreise markieren statistische Ausreißer.



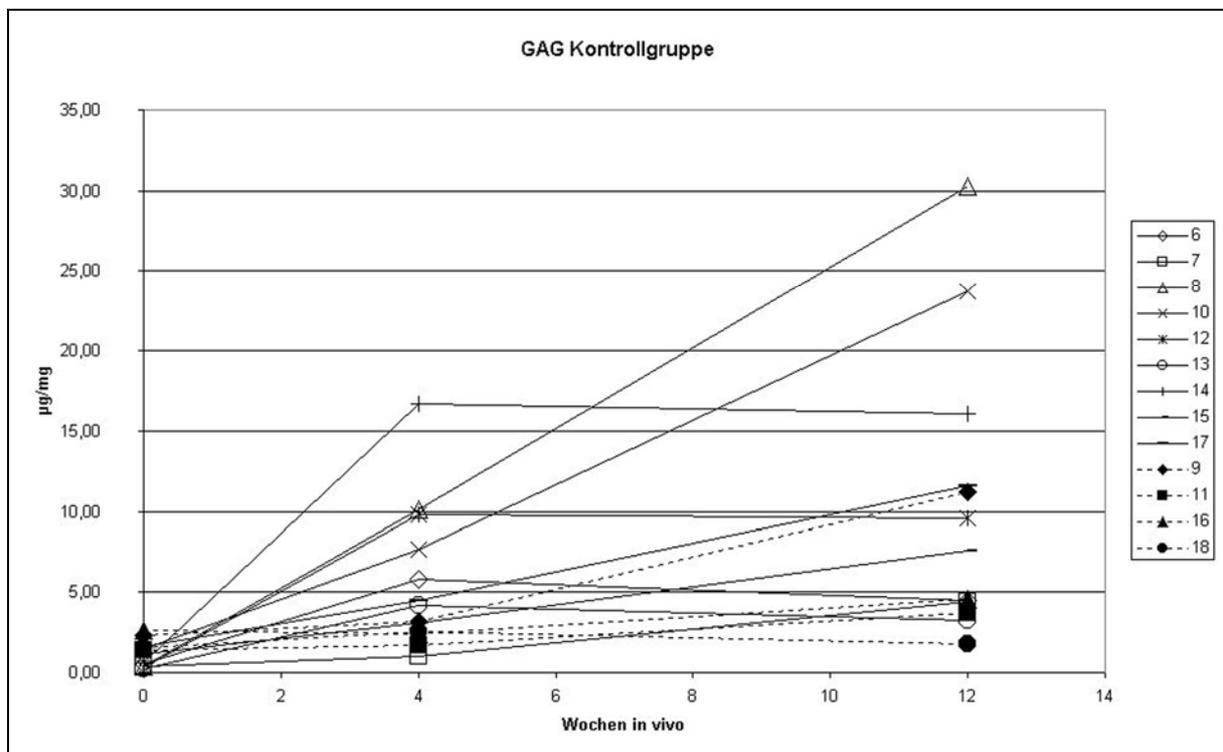
**Abbildung 25**

Zellzahl, unterschieden nach Vliestyp. Die Versuchsgruppe zeigt mit der Kontrollgruppe vergleichbare Verläufe. Kreise stellen statistische Ausreißer dar.

### 3.5.2.2 Glykosaminoglykane

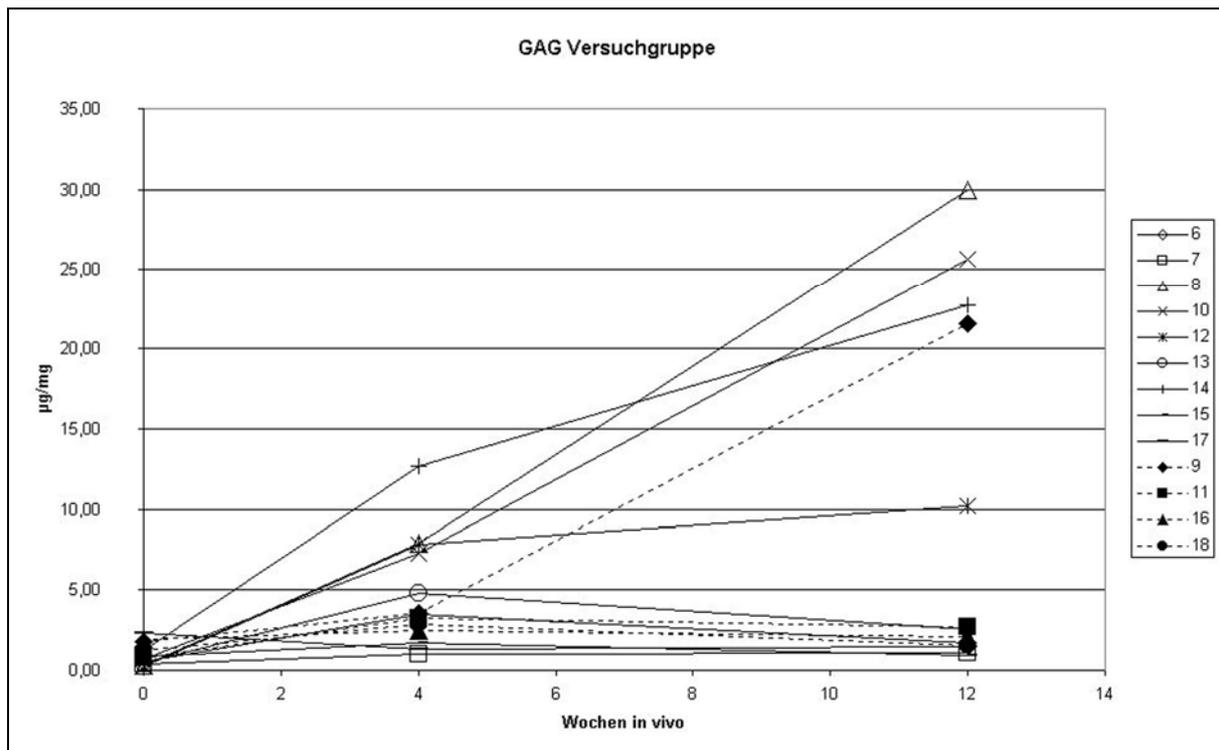
Die Messungen der Glykosaminoglykane (GAG) ergaben folgende Ergebnisse. Die Werte beschreiben die GAG-Konzentrationen bezogen auf das Nassgewicht der Vliese [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]. Nach der in vitro Phase der Studie hatten die Zellen weder in Vliesen der Kontroll- noch der Versuchsgruppe große Mengen an GAG synthetisiert ( $1,13 \pm$

0,22 µg/mg bzw.  $0,81 \pm 0,18$  µg/mg). Nach einem Monat in der Nacktmaus stieg die GAG-Konzentration in der Kontrollgruppe auf  $4,18 \pm 1,23$  µg/mg und auf  $3,5 \pm 0,94$  µg/mg in der Versuchsgruppe an. In beiden Gruppen war die Änderung der GAG-Konzentration signifikant, der Vergleich der Gruppen untereinander zeigte für diesen Zeitraum keinen signifikanten Unterschied. Mit der Zeit in vivo zeigten die beobachteten Gruppen einen unterschiedlichen Verlauf. Der GAG-Gehalt der Kontrollgruppe stieg zwischen vier und 12 Wochen in vivo auf  $8,62 \pm 2,39$  µg/mg an. Die Versuchsvliese zeigten nach zwölf Wochen eine geringere Konzentration an GAG im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Wochen in vivo ( $2,59 \pm 3,08$  µg/mg(!)) mit deutlichen interindividuellen Schwankungen. Trotz erheblich verschiedener absoluter Zahlen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 26, 27 und 28).



**Abbildung 26**

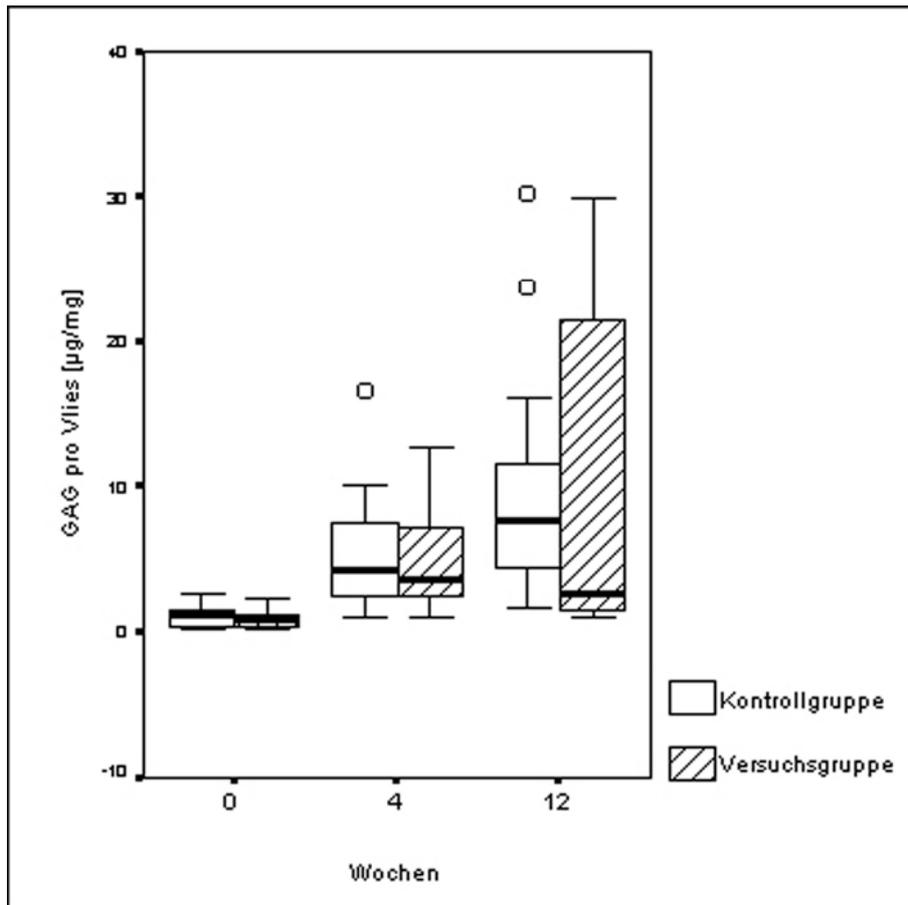
Der Gehalt an Glykosaminoglykanen steigt in vivo in mehreren Vliesen der Kontrollgruppe an. Besonders nach 12 Wochen in vivo sind die interindividuellen Schwankungen des absoluten GAG-Gehaltes ausgeprägt. Gestrichelte Linien stellen Vliese mit reduziertem PDS-Gehalt dar.



**Abbildung 27**

In der Versuchsgruppe ist nach 4 Wochen in vivo der GAG-Gehalt der Vliese mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Mit längerer Zeit in vivo sinkt der GAG-Gehalt im Median im Gegensatz zur Kontrolle (Abb. 28). Jedoch sind die interindividuellen Unterschiede sehr ausgeprägt. Gestrichelte Linien repräsentieren PDS-reduzierte Vliese.

Wieder wurden die Messwerte in Kontroll- und Versuchsgruppe nach PDS-Gehalt des Trägervlieses auf Unterschiede überprüft. In der Kontrollgruppe wiesen die Vliese mit Standard Anteil an PDS nach 0 Wochen in vivo eine GAG-Konzentration von  $0,56 \pm 0,17 \mu\text{g/mg}$  auf. Zum gleichen Zeitpunkt enthielten die PDS-reduzierten Vliese  $1,94 \pm 0,3 \mu\text{g/mg}$  GAG. Nach der Übertragung der Zell-Copolymer-Konstrukte in die Nacktmaus zeigten Vliese mit Standard PDS Anteil einen starken Anstieg des GAG-Gehaltes auf  $5,8 \pm 1,58 \mu\text{g/mg}$ , während der Gehalt der PDS-reduzierten Vliese nur wenig auf  $2,48 \pm 0,29 \mu\text{g/mg}$  anstieg. In beiden Vliestypen stieg der Gehalt an GAG mit der Zeit in vivo auf  $9,56 \pm 3,13 \mu\text{g/mg}$  (Standard PDS) und  $4,11 \pm 0,29 \mu\text{g/mg}$  (PDS-reduziert) an (Abb. 29).

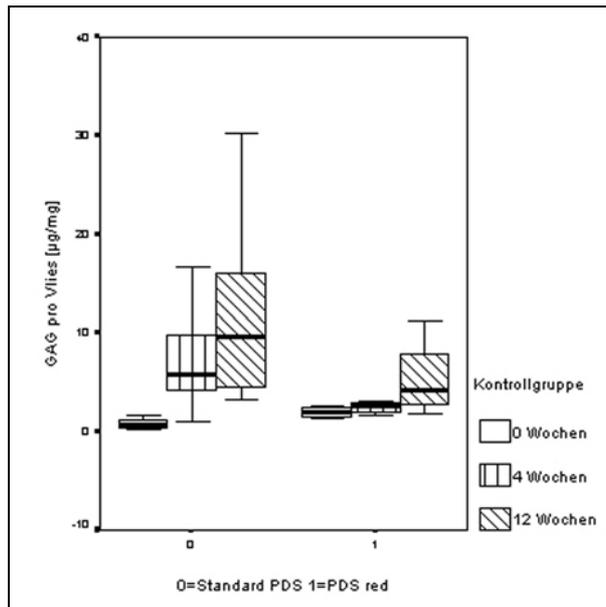


**Abbildung 28**

Die Boxplots stellen die statistischen Lagemaße des GAG-Gehalts der Vliese dar. Ähnliche Verhältnisse in Kontroll- und Versuchsgruppe zeigen sich nach der 3-D-Kultur und nach 4 Wochen in vivo. Nach 12 Wochen im Versuchstier sinkt der GAG-Gehalt der Versuchsvliese im Median, jedoch zeigen die einzelnen Vliese stark unterschiedliche Verläufe (Abb. 27). Kreise stellen statistische Ausreißer dar.

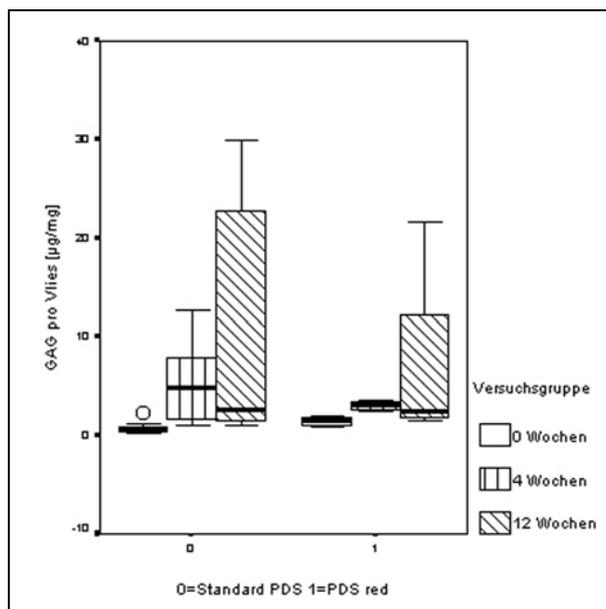
In der Versuchsgruppe zeigten beide Vliestypen ebenfalls geringe GAG-Konzentrationen nach der in vitro Phase und verhielten sich auch in vivo ähnlich. Nach vier Wochen im Versuchstier kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg des GAG-Gehalts, welcher sich aber im Gegensatz zur Kontrollgruppe nicht fortführte, sondern nach 12 Wochen im Versuchstier auf die Werte  $2,59 \pm 4,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  für Vliese mit Standard PDS und  $2,38 \pm 4,87 \mu\text{g}/\text{mg}$  für reduzierte Vliese sank. (Abb. 30)

PDS-reduzierte Vliese zeigten in beiden Gruppen bei Implantation einen höheren Gehalt an GAG als die Vliese mit Standard PDS. In vivo synthetisierten Chondrozyten auf Standard Vliesen deutlich mehr Glykosaminoglykane und wiesen in beiden Kollektiven nach 4 Wochen erheblich höhere GAG-Werte auf. Nach 12 Wochen zeigten die Vliese mit Standard PDS im Vergleich zur Implantation deutlich gestiegene GAG-Konzentrationen, während diese in PDS-reduzierten Vliesen weniger zunahm.



**Abbildung 29**

GAG-Gehalt der Kontrollvliese, aufgeschlüsselt nach Vliestyp. Nach der Übertragung in die Nacktmaus zeigen PDS-reduzierte Vliese niedrigere Werte als Vliese mit Standard PDS-Gehalt. Der Anstieg der GAG-Konzentration in vivo ist aber in beiden Vliestypen zu beobachten.



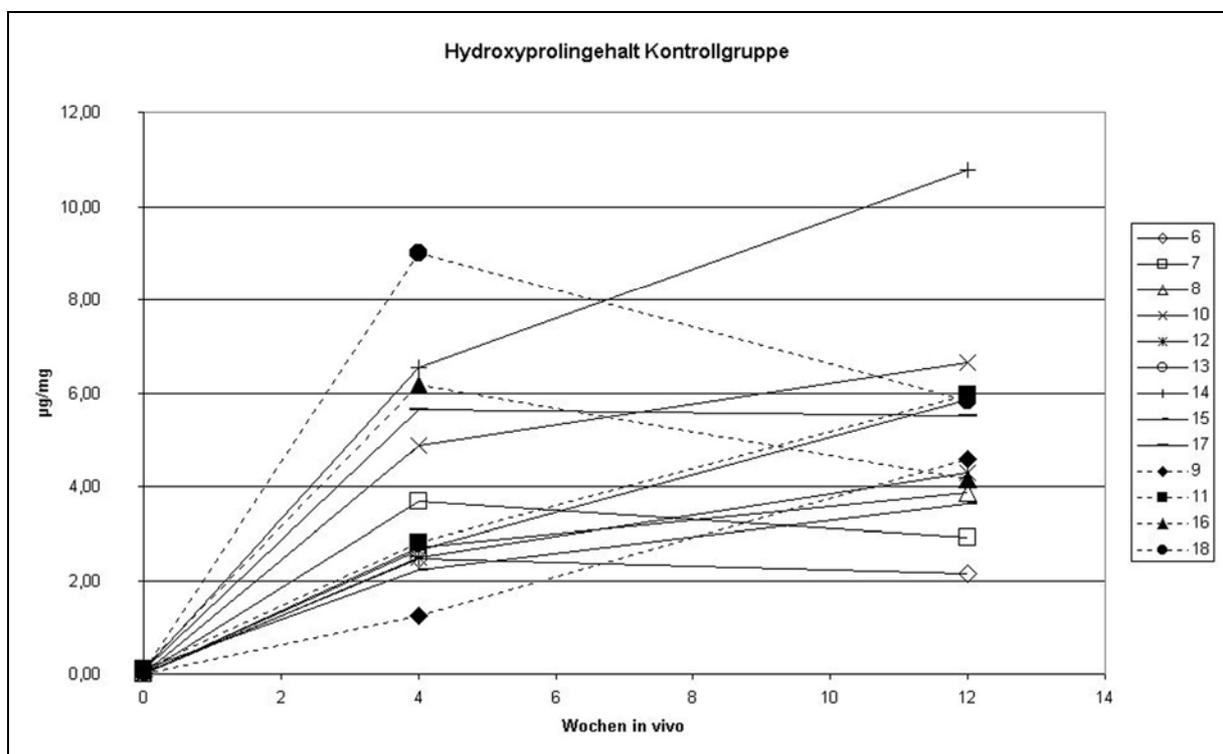
**Abbildung 30**

Die Versuchsgruppe, unterschieden nach Vliestyp. Die Vliese zeigen zu allen Zeitpunkten ähnliche Messwerte für GAG. Nach 12 Wochen in vivo sinkt der Gehalt an GAG unabhängig vom Vliestyp.

### 3.5.2.3 Hydroxyprolin

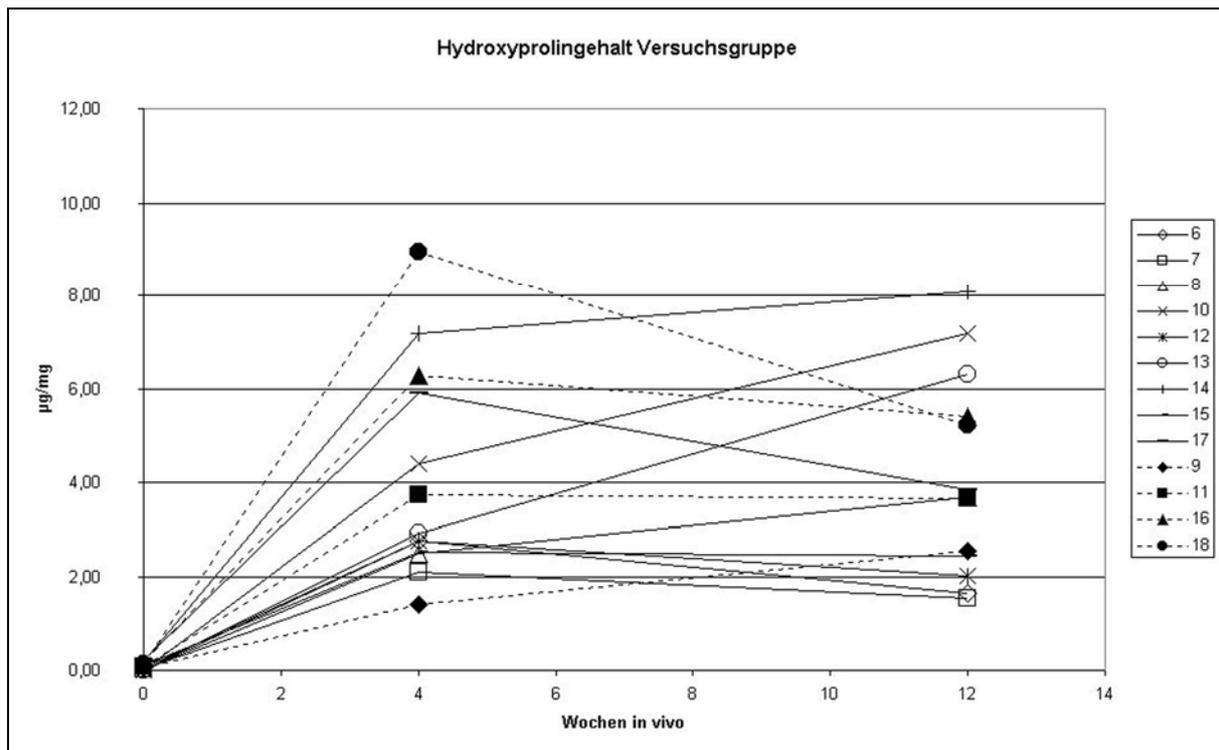
Ähnlich wie Glykosaminoglykane wurde Kollagen in der in vitro Phase nur spärlich gebildet. Dies zeigen die Messwerte von Hydroxyprolin (jeweils in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Vliesgewicht) der Kontrollgruppe ( $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) und der Versuchsgruppe ( $0,05 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) deutlich und liegen somit zum Teil unter der Sensitivität der

angewandten Methode. Erst nach der Implantation in das Versuchstier konnten nennenswerte Konzentrationen von Hydroxyprolin gemessen werden, die in beiden Gruppen ähnlich waren (Kontrollvliese  $2,81 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{mg}$ ; Versuchsvliese:  $2,91 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Der Anstieg in beiden Gruppen war signifikant im Vergleich zum Ausgangswert, im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe aber nicht signifikant unterschiedlich. Im weiteren Verlauf des Experiments stieg die Konzentration an Hydroxyprolin in beiden Gruppen weiter auf  $4,59 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  in der Kontrollgruppe und weniger ausgeprägt auf  $3,69 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  in der Versuchsgruppe an. Im Verhalten der beiden Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abb. 31, 32 und 33).



**Abbildung 31**

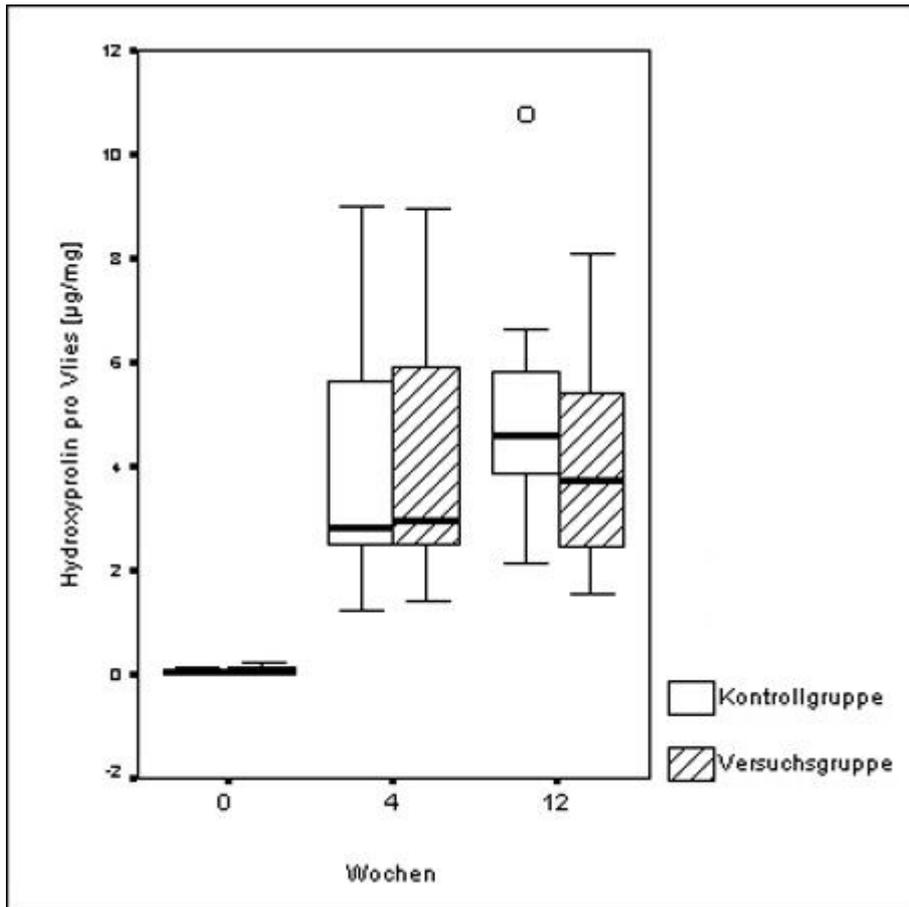
Verlauf der Hydroxyprolinkonzentration in allen, zur statistischen Auswertung herangezogenen Vliesen der Kontrollgruppe. Ähnlich wie bei GAG setzt eine nachweisbare Synthese von Hydroxyprolin erst in vivo ein. Gestrichelte Linien stellen PDS-reduzierte Vliese dar.



**Abbildung 32**

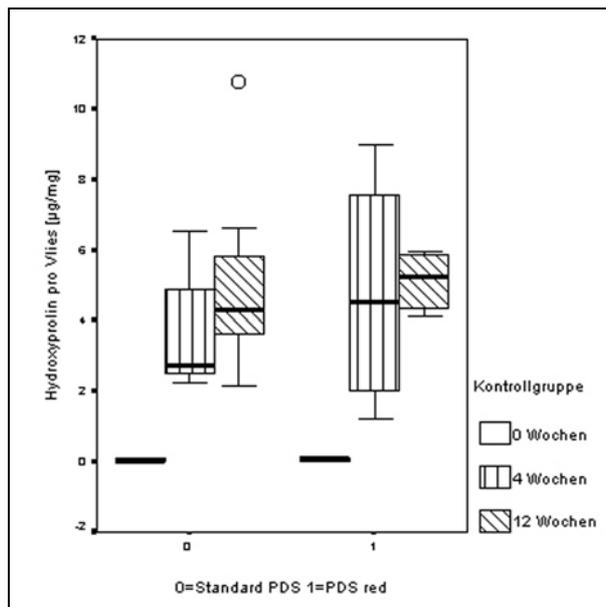
Hydroxyprolingehalt der Versuchsvliese. Zu allen Messzeitpunkten stellen sich ähnliche Verhältnisse wie in der Kontrollgruppe dar. Wieder sind nach 12 Wochen in vivo deutliche interindividuelle Unterschiede erkennbar. Gestrichelte Linien stellen PDS-reduzierte Vliese dar.

Die Hydroxyprolinkonzentrationen in der Kontroll- und Versuchsgruppe wurden bezüglich des Vliestyps untersucht. Vor der in vivo Phase lag der Hydroxyprolingehalt beider Vliestypen in der Kontrollgruppe im Bereich der Nachweisgrenze ( $0,01 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$  und  $0,08 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$  in Standard PDS, bzw. PDS-reduzierten Vliesen). Nach 4 Wochen in vivo stieg in beiden Vliestypen der Gehalt an der gemessenen Substanz auf  $2,71 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{mg}$  in Vliesen mit Standard PDS und auf  $4,49 \pm 1,74 \mu\text{g}/\text{mg}$  in PDS-reduzierten Vliesen an. Mit Dauer des Tierversuchs stieg auch der Gehalt an Hydroxyprolin in beiden Vliestypen weiter an (Abb. 34).



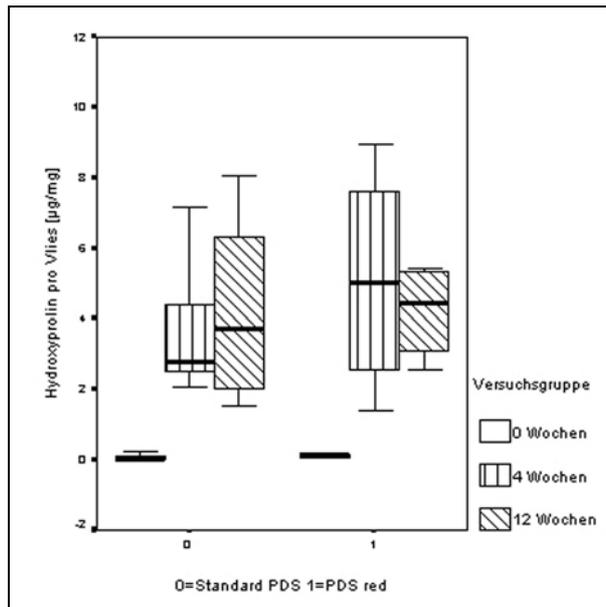
**Abbildung 33**

Vergleich der statistischen Lagemaße des Hydroxyprolinegehalts zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. Auch diese Komponente der extrazellulären Matrix sinkt in Versuchsvliesen im Median nach 12 Wochen in vivo. Kreise stellen statistische Ausreißer dar.



**Abbildung 34**

Hydroxyprolinegehalt der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Vliestyp. In vivo weisen PDS-reduzierte Vliese eine höhere Konzentration an Hydroxyprolin auf. Kreise stellen statistische Ausreißer dar.



**Abbildung 35**

Darstellung des Hydroxyprolingehalts beider Vliestypen in der Versuchsgruppe. In PDS-reduzierten Vliesen sinkt die Hydroxyprolinkonzentration nach 12 Wochen in vivo im Gegensatz zu Vliesen mit Standard PDS-Gehalt. Jedoch zeigen PDS-reduzierte Vliese in vivo immer höhere Messwerte für Hydroxyprolin.

In der Versuchsgruppe waren die Ausgangswerte beider Vliestypen ebenfalls sehr gering. Mit der Implantation in die Nacktmaus stieg die Hydroxyprolinkonzentration sowohl in Standard PDS als auch in PDS-reduzierten Vliesen stark an. Nach 12 Wochen in vivo entwickelten die PDS-reduzierten Vliese weniger Hydroxyprolin als nach 4 Wochen in vivo, während die Vliese mit Standard PDS weiterhin an Hydroxyprolin gewannen. PDS-reduzierte Vliese lieferten in vivo absolut höhere Werte als Standard Vliese, egal ob in vitro Wachstumsfaktor zugegeben worden war oder nicht (Abb. 34 und 35).

## **4 Diskussion**

Zur Durchführung rekonstruktiver Eingriffe im Kopf-Hals-Bereich wird Knorpel als formgebendes Stützmaterial sowie zur Defektdeckung häufig verwendet. Einsatzmöglichkeiten sind neben vielen anderen die Aufrichtung von Sattelnasen, die Rekonstruktion des Orbitarandes oder die Wiederherstellung des Orbitabodens nach Blow-Out-Fraktur [13, 60, 68]. Auch zur rekonstruktiv-plastischen Therapie der Mikrotie oder des traumatischen Ohrmuschelverlustes ist der Einsatz von Knorpeltransplantaten nötig [4, 99]. Jedoch steht Knorpel zu Transplantationszwecken nur limitiert zur Verfügung und beinhaltet einige Probleme. Bei der Verwendung autologen Materials besteht die Notwendigkeit eines zweiten operativen Eingriffes und häufig herrscht an der Entnahmestelle ein Mangel an Material geeigneter Größe und Qualität. Benutzt man statt dessen allogenes Knorpelgewebe, besteht die Gefahr einer Infektion sowie einer Abstoßungsreaktion auf Grund einer Immuninkompatibilität trotz der immunologisch privilegierten Position des primär avaskulären Knorpels [46].

Eine mögliche Lösung der angesprochenen Probleme könnte die Technik des Tissue Engineering von Knorpelgewebe darstellen. Dieser verhältnismäßig junge Forschungszweig ist charakterisiert durch die Zusammenarbeit mehrerer Disziplinen aus Naturwissenschaft und Technik. In den vergangenen Jahren sind erhebliche Fortschritte im Bereich des Tissue Engineering von Knorpel gemacht worden. Besonders durch die Entwicklung geeigneter Kulturbedingungen und Trägermaterialien konnte die Herstellung von Knorpelgewebe in vitro und in vivo verbessert werden [19, 35, 37, 132, 133].

### **4.1 Wachstumsfaktoren und Knorpel**

Die Aufklärung der physiologischen Rolle von Wachstumsfaktoren im Stoffwechsel von nativem und pathologisch verändertem Knorpel lässt Untersuchungen zum Einsatz dieser Faktoren im Rahmen des Tissue Engineering von Knorpel sinnvoll erscheinen. Wachstumsfaktoren beeinflussen die Wundheilung und Entzündungsreaktion in Binde- und Stützgewebe, aber auch die Syntheseleistung und das Proliferationsverhalten von Chondrozyten [9, 128, 129]. Besonders IGF-1 und TGF- $\beta$ -2 spielen in der Steuerung dieser Prozesse eine große Rolle. Yaeger beschreibt in einer Studie an dedifferenzierte humanen adulten Gelenkchondrozyten

in Alginat-Kultur, die Wiederaufnahme knorpelspezifischer Syntheseleistungen nach der Verwendung einer Kombination von TGF $\beta$  und IGF-1 [152]. Die optimal wirksamen Konzentrationen von IGF-1 und TGF $\beta$  nach Yaeger wurden in der vorliegenden Arbeit an humanen Septumchondrozyten überprüft.

Der Peptidfaktor Insulin-like Growth Factor (IGF) weist große strukturelle Homologie mit dem namensgebenden Insulin auf und wirkt hauptsächlich über die Bindung an einen spezifischen, membranständigen Rezeptor. Relativ große Mengen dieses Peptids zirkulieren gebunden an spezifische Proteine und somit biologisch inaktiv im Blutstrom. IGF vermittelt die Wirkung von Wachstumshormon (= Somatotropin) aus der Hypophyse auf eine Vielzahl von Organen und Geweben, z.B. Knorpel und Knochen. Ein ursprünglich angenommener, überwiegend endokriner Wirkmechanismus von IGF-1 bestätigte sich jedoch nicht [44, 97, 103]. Der Nachweis reichhaltiger Ablagerungen von IGF in der ECM von Knochen und Knorpelgewebe deutet auch auf eine lokale Synthese dieses Wachstumsfaktors hin [97, 153]. Ein autokriner und/oder parakriner Wirkmechanismus ist daher zu vermuten [44, 61, 129]. Obwohl die Aminosäuresequenz sowie die räumlichen Struktur des IGF-Moleküls schon vor einiger Zeit entschlüsselt werden konnten [106, 117], ist seine biologische Funktion weit weniger klar. Zwar herrscht über den anabolen Charakter der Wirkung von IGF-1 weitgehende Einigkeit, jedoch ist dessen Regulation sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt [118].

Studien an explantiertem Knorpelgewebe in vitro deuten auf einen anabolen Effekt von IGF hinsichtlich der GAG-Synthese hin [43, 58]. Dunham zeigt einen mitogenen Effekt von IGF auf dedifferenzierte humane Septum-Chondrozyten in Monolayer [28]. Rattenchondrozyten reagieren ähnlich auf Stimulation durch IGF-1 [130]. Anabole Effekte konnten auch in dreidimensionalen Kulturbedingungen festgestellt werden. Bei primären bovinen Gelenkchondrozyten in einem PGA-Vlies führt IGF-1 verglichen mit den Kontrollen nach 4 Wochen zu signifikant größeren und schwereren Konstrukten [8]. Van Susante berichtet von einer gesteigerten Zellteilung und GAG-Synthese boviner Chondrozyten in Alginatkultur [143]. Diese Ergebnisse lassen den Einsatz von IGF-1 für die Züchtung humanen Septumknorpels mit den Methoden des Tissue Engineering sinnvoll erscheinen.

Transforming Growth Factor  $\beta$  ist ein nahezu ubiquitär vorkommendes Peptid-Homodimer mit einem Gewicht von 25 kD. Es ist Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie mit über 50 strukturell ähnlichen, aber funktionell divergenten Zytokinen [10, 42]. Zur Zeit kennt man fünf TGF $\beta$ -Isoformen, über deren unterschiedliche Funktion noch wenig bekannt ist. Vielmehr scheinen sich ihre Wirkungen, wie zum Beispiel bei TGF $\beta$ 1 und 2, sehr zu ähneln [86, 152]. TGF $\beta$  werden mannigfaltige Einflüsse auf beinahe jedes Gewebe und jeden Zelltyp zugesprochen, einschließlich Proliferations- und Differenzierungsvorgängen. Seine Wirkungen werden durch Bindung an spezifische, membranständige Rezeptoren vermittelt. Mehrere Bindungsproteine und einige Bestandteile der ECM modulieren die Wirkung von TGF $\beta$  in hochkomplexer Manier. In mehreren Geweben stimuliert TGF $\beta$  die Synthese von Bestandteilen extrazellulärer Matrix und verhindert deren Abbau durch die Regulation der Synthese und Funktion einiger kataboler Enzyme [107]. TGF $\beta$  spielt eine gewichtige Rolle in der Chondrogenese, da die Induktion einer chondrozytenartigen Differenzierung von embryonalen, aber auch adulten mesenchymalen Stammzellen gezeigt werden konnte [78, 97, 119]. Die Vielzahl an Wirkungen von TGF $\beta$  erklärt zudem die synonyme Bezeichnung Polyergin für TGF $\beta$  [10, 85, 86, 108, 125]. Zahlreiche Autoren beschreiben einen vielfältigen und zum Teil widersprüchlichen Einfluss auf reife Chondrozyten. Bujia berichtet von einer mitogenen Wirkung auf humane Septumchondrozyten in Monolayer bei gleichzeitiger Inkubation mit Epidermal Growth Factor (EGF) und konnte in weiteren Studien auch einen positiven Effekt auf die Protein- und Glykosaminoglykansynthese nachweisen [17, 20]. Ähnliche Ergebnisse erzielt Jakob nach Expansion von humanen Gelenkchondrozyten [66]. Bei der Verwendung humaner und porciner aurikulärer Chondrozyten konnte Arévalo-Silva jedoch weder in vitro noch in vivo einen positiven Einfluss von TGF $\beta$  auf die Proliferation und Syntheseleistungen der Zellen feststellen [2]. Galéra zeigt in seiner Studie den unterschiedlichen Effekt des Zytokins auf die Kollagensynthese in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zelle. Primäre Kaninchenchondrozyten reagieren auf TGF $\beta$ -Zugabe mit einer verminderten, dedifferenzierte Zellen mit einer erhöhten Synthese von Kollagen [45]. Eine Vielzahl weiterer Untersuchungen kommt zu unterschiedlichen Erkenntnissen hinsichtlich der Wirkung von TGF $\beta$  [8, 58, 61, 62, 65, 80, 104, 137, 146, 152]. Zu erklären sind diese konträren Aussagen vermutlich durch die sehr unterschiedlichen Kulturbedingungen und die Verwendung von Zellen verschiedener Spezies [128, 129]. Trotz dieser Unklarheiten steht außer Frage, dass

TGF $\beta$  in den Metabolismus von Knorpelgewebe eingreift. Die verhältnismäßig spärlichen Erkenntnisse über die Wirkung von TGF auf humane Septumknorpelzellen [139] und der zweifellos vorhandene Bedarf an Knorpelgewebe in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich sind hinreichende Argumente, um den Nutzen von TGF für die Züchtung humanen Septumknorpels zu untersuchen.

Mehrere Einflussgrößen modulieren die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Chondrozyten. Diese sind unter anderem die Herkunft, das Alter und der Differenzierungsgrad der Zelle sowie weitere Umweltbedingungen, wie das Vorhandensein anderer Wachstumsfaktoren oder Serum im Kulturmedium. Zudem ist noch wenig über den Einfluss mechanischer Stimulation auf die Physiologie des Knorpelgewebes bekannt und es ist zu vermuten, dass auch dieser Faktor die Funktion von Zytokinen moduliert [138]. Weitere Regelgrößen sind das Stadium des Zellzyklus während des Einwirkens eines Wachstumsfaktors, das Alter des Spenders und das Vorhandensein von extrazellulärer Matrix [52, 141]. Aus dem Gesagten wird deutlich, dass die Wirkung einer Kombination von Wachstumsfaktoren, selbst bei gut etablierter Wirkung der Einzelfaktoren in einem definierten System, bei Anwendung unter nur leicht veränderten Bedingungen schwer vorherzusagen ist.

## **4.2 Verhalten der Konstrukte in vitro**

Nach drei Wochen in 3-D-Kultur in vitro konnten keine nennenswerten Konzentrationen von GAG und Kollagen in den Zell-Copolymer-Konstrukten nachgewiesen werden (Abb. 26, 27 und 31, 32). Möglicherweise können in vitro die synthetisierten Matrixbestandteile nicht in den Konstrukten zurückgehalten werden. Mehrere Autoren weisen in getrennten Studien daraufhin, dass die von den Chondrozyten neu synthetisierte Matrix in das Kulturmedium abdiffundieren kann [16, 51, 121, 144]. Die Untersuchung von eingekapselten Copolymer-Konstrukten unter Verwendung von Alginaten, Agarose oder Fibringel führte in Versuchen anderer Forschergruppen zur deutlicher Deposition von ECM nach einer Kultur in vitro und scheint die Matrixbestandteile in den Konstrukten zu fixieren [87]. Andererseits enthält die Literatur zahlreiche Berichte über nachweisbar abgelagerte ECM bei Verwendung vliesartiger Strukturen schon nach in vitro Kultivierung [35-37], ohne dass eine Einkapselung in Gel oder Ähnliches notwendig gewesen wäre. Jedoch berichten auch van Osch und Rotter von geringer Matrixdeposition durch humane

Chondrozyten nach Versuchen in vitro [109, 139]. Ähnliches zeigt Martin bei der Verwendung boviner Gelenkchondrozyten nach zwei Passagen in Monolayer und einer Woche auf PGA-Vliesen [84].

Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Kulturbedingungen sind an einem klinischen Einsatz des Tissue Engineering von Nasenseptumknorpel orientiert. Dies schließt die Verwendung adulter humaner Chondrozyten ein, die zunächst stark vermehrt werden müssen, bevor die Züchtung von Geweben brauchbarer Größe überhaupt möglich ist. Studien, die von starker Matrixdeposition in vitro berichten, unterscheiden sich hiervon durch abweichende Kulturmodelle und -techniken. Unterschiede bestehen unter anderem im Typ der verwendeten Chondrozyten und deren Differenzierungsgrad, in der Zelldichte in 3-D-Kultur, in der Art des Trägermaterials sowie im Einsatz von Bioreaktoren. Es ist bekannt, dass diese Faktoren die Matrixsynthese von Knorpelzellen beeinflussen [6, 36, 41, 51, 58, 62, 130, 139, 142, 150]. Weitere Untersuchungen zur Optimierung des Kultursystems im Allgemeinen sowie dem Verhalten von Chondrozyten in Ethisorb-Vliesen unter in vitro Bedingungen im Speziellen sind daher erforderlich.

Eindeutig festzuhalten ist die relativ geringe Effizienz der Besiedelung der Copolymervliese mittels Kapillarkwirkung in diesem Experiment. Von ursprünglich  $5 \times 10^6$  eingesetzten Zellen pro Vlies, kann nach der Zeit in vitro nur ein Gehalt von etwa  $5 \times 10^5$  Zellen pro Vlies errechnet werden. Da man von einer Proliferation der Zellen in 3-D-Kultur ausgehen muss [37, 38, 69], war die ursprüngliche Zelldichte wohl noch geringer. Freed [37] berichtet von ähnlichen Zellularitäten nach Kapillarseeding auf PGA-Vliesen, jedoch proliferieren die primären Rinderchondrozyten in dieser Studie massiv in vitro und beginnen auch mit der GAG-Synthese. Untersuchungen von Rotter zeigen eine Seedingeffizienz zwischen 20 und 25 % mit vergleichbaren Methoden für primäre humane Septumchondrozyten [111]. Um Chondrozyten optimale Bedingungen für die Redifferenzierung und die Synthese knorpelspezifischer Matrix zu bieten, ist eine relativ hohe Zelldichte in dreidimensionaler Kultur nötig, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ermöglicht [100, 136]. Vunjak-Novakovic berichtet von einer hoch effizienten Besiedelung der Trägermaterialien durch dynamisches Zellseeding und einem positiven Einfluss auf das gezüchtete Knorpelgewebe [149]. Diese verhältnismäßig aufwändige Besiedelungsmethode könnte auch für das Tissue Engineering humanen Septumknorpels verwendet werden.

Bekanntermaßen benötigen Chondrozyten zur Synthese knorpelspezifischer Matrix gewisse Milieubedingungen, die denen in nativem Knorpel zumindest ähneln [134]. Dazu gehören wie angesprochen eine gewisse Zelldichte, die Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen ermöglichen kann [100, 136, 148-150]. Auf Grund der geringen Zelldichte in den Vliesen zum einen und der fehlenden Akkumulation extrazellulärer Moleküle, wie Kollagen oder Aggrecan (GAG), zum anderen, sind die geringen Messwerte für Hydroxyprolin und GAG nach der in vitro Phase dieser Arbeit zu erklären.

Der Einfluss der getesteten Wachstumsfaktoren ist nach der in vitro Phase des Experiments uneinheitlich. Makroskopisch können keine Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch die quantitativen Parameter zeigen ähnliche Ergebnisse. Nur bei den Nassgewichten kann ein signifikanter Einfluss der Wachstumsfaktoren gezeigt werden. Die Vliese der Versuchsgruppe zeigen ein deutlich höheres Nassgewicht (Abb. 16, 17, 18). Dieser Unterschied ist nur schwer zu erklären, da die Konstrukte im Median zellärmer sind als jene der Kontrollgruppe und in beiden Gruppen die Deposition der untersuchten Matrixbestandteile, wie erwähnt, noch gering ist. Möglicherweise ist die Deposition extrazellulärer Matrix zu diesem Zeitpunkt des Experiments nicht eindeutig durch die Bestimmung von Glykosaminoglykanen und Hydroxyprolin mit den verwendeten Methoden erkennbar. Denkbar ist, dass die Zellen in vitro weitere Produkte synthetisieren, die durch die benutzten Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnten und für den Gewichtsanstieg verantwortlich sind. Fehlende histologische Schnitte der Konstrukte nach 0 Wochen in vivo erschweren die Interpretation der biochemischen Untersuchungen. Die Verwendung von immunhistochemischen Methoden oder der Nachweis von Aggrecan oder Kollagen-Typ-II-mRNA könnten sich zu diesem Zweck als geeigneter erweisen [84, 152]. Eine weitere Charakterisierung der Zusammensetzung der Konstrukte in dreidimensionalen Kulturen in vitro ist daher nötig.

Zusätzlich können interindividuelle Unterschiede in der Porosität der Trägermaterialien nicht zur Gänze ausgeschlossen werden, was wenigstens zum Teil für die Gewichtsunterschiede verantwortlich gemacht werden könnte.

### **4.3 Verhalten der Konstrukte in vivo**

In der Vergangenheit konnte eine fortgeführte Chondrogenese mit Zellproliferation und Produktion von ECM nach Implantation von Zell-(Co)Polymer-Konstrukten in Versuchstiere nachgewiesen werden [2, 35, 82, 101, 109, 110, 132]. Vacanti zeigt schon nach 8 Tagen in vivo die Entwicklung eines unreifen, knorpelartigen Gewebes [132], welches mit längerer Zeit im Tier Charakteristika reifen Knorpels aufweist. Auch in der vorliegenden Arbeit kommt es, trotz des fehlenden Nachweises knorpelspezifischer Matrix in vitro, nach 4 und 12 Wochen in vivo zu nachweisbarer Knorpelbildung. Ähnliche Verläufe sind in der Literatur beschrieben [81, 109, 139]. Die Verwendung von Wachstumsfaktoren zur Optimierung der Knorpelherstellung ist Gegenstand reger Forschung auf dem Gebiet des Tissue Engineering. Viele Studien beschäftigen sich mit der Charakterisierung der Effekte von Wachstumsfaktoren auf die Chondrogenese tissue-engineerter Gewebe in vitro [8, 138, 140-142]. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss von in vitro zugegebenen Wachstumsfaktoren auf das Verhalten der Zell-Copolymer-Konstrukte in vivo kaum untersucht [1, 2, 75, 76]. Im Folgenden sollen die hier erhobenen Daten nach Explantation mit denen anderer Studien zum Knorpel Tissue Engineering verglichen werden.

#### **4.3.1 Gewicht**

Die signifikanten Unterschiede im Nassgewicht nach dreidimensionaler Kultur in vitro gleichen sich mit der Zeit in vivo immer weiter an. Sowohl die Versuchsvliese als auch die Kontrollvliese nehmen mit andauernder Implantationszeit an Gewicht ab (Abb. 17, 18, 19). Wie schon von Freed für in vitro Experimente beschrieben, ist dies durch den anhaltenden hydrolytischen Zerfall und enzymatischen Abbau der Trägerstruktur zu erklären, der die Gewichtszunahme durch Neusynthese extrazellulärer Matrix und Zellproliferation übersteigt [39, 40]. Ähnliche Verhältnisse liegen in vivo vor. Nach 8 bis 12 Wochen in der Nacktmaus ist das Trägermaterial schon deutlich resorbiert und hat an mechanischer Integrität verloren, ist aber immer noch mikroskopisch zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass sich das Gewicht mit der Zeit, durch zunehmende Beseitigung der Vliesfasern und gleichzeitig weiterbestehender Synthese extrazellulärer Matrix, um einen konstanten Wert einpendeln wird. Die Zugabe von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 beeinflusst diesen Gewichtsverlust nicht. In vivo sind die Versuchsvliese im Median sogar leichter als die Kontrollen (Abb. 16, 17, 18). Die von Blunk [8] in vitro festgestellten anabolen

Effekte von IGF-1 und TGF $\beta$  auf das Nassgewicht von Knorpelzell-Polymer-Konstrukten können somit in vivo unter den beschriebenen Kulturbedingungen nicht bestätigt werden.

#### **4.3.2 Zellzahl**

Zellen in der Versuchs- und Kontrollgruppe zeigen nach vier Wochen in vivo deutliche Proliferationstendenz (Abb. 21, 22, 23). Die Zellzahlen sind in beiden Gruppen signifikant höher als zum Zeitpunkt der Implantation. Nach 12 Wochen in vivo kommt es in beiden Gruppen zu einer Verringerung der Zellzahl der Konstrukte, jedoch auf deutlich höherem Niveau als nach der in vitro Phase. Diese Beobachtung ist zum einen auf eine Reifung des Gewebes zurückzuführen, die ähnlich auch bei der Entwicklung nativen Knorpels zu beobachten ist. Dieser ist in unreifem Zustand zellreich und wird mit fortschreitendem Alter immer zellärmer. Zum anderen können auch fortschreitende Resorptionsvorgänge in vivo zu einer Reduktion der Zellzahl führen, die auch angesichts des Gewichtsverlaufs anzunehmen sind. Einen vergleichbaren Verlauf der Zellzahlen beschreibt Riesle bei der Verwendung boviner Chondrozyten in vitro [105]. In vivo Studien von Puelacher zeigen nach 6 und 12 Wochen ebenfalls eine geringere Zelldichte als nach 3 Wochen, was der Autor mit einer angenommenen Reifung des Gewebes begründet. Der Nachweis von Lakunen im histologischen Schnitt, sowie die weiter gehende Deposition extrazellulärer Matrix bestätigen die Vermutung [100]. Vacanti spricht bei der Verwendung boviner Gelenkchondrozyten ebenfalls von einer Reifung der Konstrukte, da er nach 81 Tagen in vivo Lakunen im gezüchteten Gewebe nachweisen kann, macht aber keine Aussagen über die Zellularität der Konstrukte [132]. Auch hinsichtlich dieses Parameters unterscheiden sich Versuchs- und Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt signifikant. Vielmehr nähern sich die Zellzahlen mit längerer Zeit in vivo immer näher an. Der mitogene Effekt von IGF-1 und TGF $\beta$ -2, wie er in der Literatur häufig erwähnt wird [20, 23, 25, 28, 44, 130, 143], ist hier also nicht zu beobachten.

#### **4.3.3 Glykosaminoglykan und Hydroxyprolin**

Knorpel ist ein zellarmes Gewebe, welches seine außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften seiner hochspezifischen extrazellulären Matrix (ECM) verdankt. Diese gleichzeitig druckelastische und zugfeste Matrix enthält neben einem hohen Wassergehalt von etwa 90 % hauptsächlich Proteoglykane und Kollagen II. Diese Makromoleküle sind maßgeblich für die beeindruckenden Eigenschaften von Knorpel

verantwortlich [14, 74]. Knorpelgewebe, das mit den Mitteln des Tissue Engineering hergestellt worden ist, soll somit eine ECM besitzen, die dem natürlichen Vorbild möglichst ähnlich ist. Ein wesentlicher Bestandteil der Herstellung knorpelartiger Gewebe ist daher die Stimulation der in ein Trägermaterial eingesetzten Zellen zur Synthese dieser Bausteine der ECM. Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und TGF $\beta$ -2 werden von verschiedenen Gruppen zu diesem Zweck verwendet [2, 8, 17, 20, 94, 136, 139, 142, 152, 154]. Im vorliegenden Experiment kommt es in vivo zu einem Anstieg der ECM-Synthese in den Konstrukten (Abb. 26, 27 und 31, 32), die Werte für nativen Septumknorpel, wie von Rotter [114] bestimmt, werden jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht. Besonders nach 4 Wochen in vivo zeigen Vliese der Versuchs- und Kontrollgruppe vergleichbare Werte für GAG und Hydroxyprolin (Abb. 28 und 33), einem etablierten Indikator für die Gesamtkollagensynthese [74, 126, 151]. Nach 12 Wochen im Versuchstier steigt der Gehalt an Matrixbestandteilen in Vliesen der Kontrollgruppe weiter an. Ähnlich verläuft die Deposition der ECM auch in der Versuchsgruppe, nur weniger ausgeprägt. Die GAG-Deposition nimmt dort jedoch nach 12 Wochen im Median leicht ab. Freed berichtet von einem ähnlichen Verlauf der GAG-Deposition in vivo bei Benutzung eines reinen PGA-Vlieses, besiedelt mit bovinen artikulären Chondrozyten [37]. Betrachtet man die ähnliche Entwicklung der Kontroll- und Versuchsvliese im vorliegenden Versuchsaufbau, so haben IGF-1 und TGF $\beta$ -2 keinen anabolen Einfluss auf die Synthese extrazellulärer Matrix in Copolymer-Konstrukten auf Basis humaner Septumchondrozyten in vivo.

#### **4.4 Diskussion der quantitativen Ergebnisse**

Bei keinem erhobenen Parameter kann ein positiver Effekt der benutzten Wachstumsfaktoren festgestellt werden. Nur das Nassgewicht nach der in vitro Phase wird signifikant von der Zugabe der Wachstumsfaktoren beeinflusst. Wie schon oben beschrieben, ist das Gewicht jedoch ein vergleichsweise wenig verlässlicher Parameter und kann von vielen schlecht kontrollierbaren Einflüssen verfälscht werden. Alle biochemischen Untersuchungen deuten konsistent auf einen fehlenden Effekt der Zytokine hin. Dies steht im Gegensatz zur berichteten Stimulation der Proliferation und ECM-Produktion von Chondrozyten durch diverse Wachstumsfaktoren [8, 17, 80, 130, 139, 140, 152, 154]. Yaeger zeigt bei der Untersuchung humaner Gelenkchondrozyten einen positiven Einfluss von IGF-1 und TGF $\beta$  auf die Synthese von Kollagen-Typ-II- und Aggrecan-mRNA und liefert mit

seinen Erkenntnissen die Grundlage für die in dieser Arbeit eingesetzten Wachstumsfaktorkonzentrationen [152]. Jedoch unterscheiden sich die von Yaeger und anderen Autoren verwendeten Modellsysteme meist deutlich vom hier verwendeten Versuchsaufbau und könnten daher die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erklären.

Viele Autoren verwenden Knorpelzellen tierischen Ursprungs, mehrheitlich Rinderchondrozyten. Jedoch ist zu bedenken, dass deutliche Speziesunterschiede zwischen den verwendeten Knorpelzellen bestehen [58, 62, 130, 139, 142]. Auch bei der Verwendung humaner Chondrozyten reagieren Zellen aus verschiedenen anatomischen Lokalisationen unterschiedlich auf externe Stimuli. In der Literatur wird der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf humane Zellen überwiegend an humanen Gelenkchondrozyten untersucht [54, 66, 136]. Über die Wirkung von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 auf humane Septumchondrozyten ist aber immer noch wenig bekannt [17, 20, 28, 139]. Der von Yaeger beschriebene positive Effekt von IGF-1 und TGF $\beta$  auf die Redifferenzierung von Gelenkknorpelzellen [152], konnte bei den hier verwendeten humanen Nasenseptumchondrozyten, trotz identischer Konzentrationen, nicht bestätigt werden. Die vorliegende Arbeit ist demnach ein weiteres Indiz dafür, dass die Wirkung der Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF $\beta$  auf Chondrozyten nicht nur von der untersuchten Spezies, sondern auch vom anatomischen Ursprung der Zellen abhängt.

Eine weitere Begründung für die abweichenden Ergebnisse in dieser Arbeit liegt auch im Differenzierungsgrad der verwendeten Zellen. Zum Einsatz tissue-engineerter Gewebe beim Menschen müssen die Spenderzellen in vitro stark vermehrt werden, um Transplantate geeigneter Größe herstellen zu können [19, 72, 121, 134]. Der Einsatz von Monolayer-Kulturen hat sich zu diesem Zweck bewährt, führt aber zu einem fortschreitenden Verlust des knorpelspezifischen Phänotyps der Zellen [6, 51, 147]. Da tierische Knorpelzellen nahezu unbegrenzt zur Verfügung stehen, studieren viele Autoren die Wirkung von Wachstumsfaktoren an dreidimensionalen Kulturen primärer, knorpeltypisch differenzierter Zellen [8, 23, 25, 94, 140, 143]. In einigen Arbeiten wird jedoch auf die unterschiedlichen Effekte der Wachstumsfaktoren auf Zellen verschiedener (De-)Differenzierungsstufen ausdrücklich hingewiesen [25, 28, 128, 129, 152]. De Haart berichtet von einem proliferativen Effekt von TGF $\beta$ -2 auf primäre bovinen Chondrozyten in Monolayer-Kulturen, der in späteren Passagen nicht mehr zu erkennen war [25]. Ähnliches zeigt

Guerne für humane Gelenkchondrozyten [54], während van der Kraan eine Stimulation der Zellteilung und der Glykosaminoglykansynthese mit fortschreitender Dedifferenzierung anspricht [135]. In Studien von Galéra zeigen differenzierte Kaninchenchondrozyten nach Zugabe von TGF $\beta$  eine verringerte Kollagensynthese, während diese Zellen im dedifferenzierten Zustand mit einer erhöhten Synthese von Kollagen auf diesen Faktor reagieren [45]. Für den klinischen Einsatz von Tissue Engineering ist eine Vermehrung der initial vorhandenen Zellen unumgänglich. Daher ist die Untersuchung der Wirkung von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 speziell auf amplifizierte und damit dedifferenzierte humane Chondrozyten für die Etablierung dieser Technik erforderlich, da nur diese Zellen für die Verwendung beim Menschen in Frage kommen.

Zusätzlich wird in der vorliegenden Arbeit während der gesamten Zeit in vitro ein Kulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Es herrscht weitgehende Übereinstimmung, dass FCS positiven Einfluss auf Zellkulturen hat, weshalb es traditionell als Zusatz zu Kulturmedien verwendet wird. Einige Zellreihen, zum Teil auch Chondrozyten, vermehren sich in serumfreien Medien nur suboptimal [142]. Jedoch ist die Zusammensetzung von Serum nicht vollständig bekannt und die vermutlich für diese förderlichen Effekte verantwortlichen Serumbestandteile sind weitgehend undefiniert [28, 152]. Yaeger zeigt in einer Studie große Unterschiede in der Wirkung verschiedener Serum-Chargen auf Chondrozytenkulturen [152]. Serumhaltige Medien stellen somit wenig definierte und schlecht steuerbare Kulturbedingungen dar, deren Interaktion mit weiteren Mediumadditiven kaum vorherzusehen ist [34, 146]. Beispielsweise deuten Studien von Jakob auf Inhibitoren im Serum hin, welche die Wirkung von FGF-2, PDGF und EGF auf die Redifferenzierung von Zellen in dreidimensionaler Kultur, im Vergleich zu serumfreien Kulturen, hemmen [66]. In der vorliegenden Studie wurde den Kulturen Serum zugesetzt, um den gegenüber Zellen tierischen Ursprungs deutlich anspruchsvolleren humanen Chondrozyten möglichst optimale Kulturbedingungen zu bieten [113, 139, 142].

Häufig wird auch von der Wirkung eines einzelnen Wachstumsfaktors berichtet. Anhand dieser Erkenntnisse auf die Effekte von Wachstumsfaktorkombinationen zu extrapolieren, ist jedoch nur schwer möglich [52, 58, 61, 62, 128, 129]. Vielmehr deuten Untersuchungen über die Wirkung von Wachstumsfaktorkombinationen auf eine gegenseitige Beeinflussung und Modulation der eingesetzten Peptide hin [92,

130]. Beispielsweise zeigt Hill bei der gleichzeitigen Zugabe von TGF $\beta$  und IGF zu Chondrozyten des Hühnerembryos eine Aufhebung des proliferativen Effektes durch IGF alleine [61, 62]. Möglicherweise inhibieren sich die Wirkungen der Faktoren im vorliegenden Fall gegenseitig oder führen in Kombination zu anderen zellulären Antworten, als nach der alleinigen Applikation zu erwarten wäre. Weitere Studien über den gleichzeitigen Einsatz mehrerer Wachstumsfaktoren für die Zwecke des Tissue Engineering aus humanen Zellen müssen zur Klärung dieser Fragen unternommen werden.

Auf Grundlage der von Yaeger erzielten Erkenntnisse zur effektiven Konzentration von IGF-1 und TGF $\beta$ , kamen die in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsfaktordosen zu Stande [152]. Jedoch herrscht in der Literatur keine Einigkeit über die günstigste Konzentration von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 und zum Teil weicht der untersuchte Wachstumsfaktorgehalt deutlich vom hier verwendeten ab. Van Osch berichtet bei der Verwendung von jeweils 10 ng/ml IGF-1 und TGF $\beta$ -2 von keinem einheitlichen Effekt auf die Redifferenzierung von humanen aurikulären Chondrozyten [142]. Anabole Effekte von TGF $\beta$  und IGF-1 in Konzentrationen von 30 bzw. 50 ng/ml beschreibt Blunk bei der Untersuchung boviner Gelenkchondrozyten [8]. Bei der Analyse von Rattenchondrozyten erzielt Tsukazaki eine gesteigerte DNA- und GAG-Synthese nach der Zugabe von 1 ng/ml TGF $\beta$  in Kombination mit 25 ng/ml IGF-1 [130]. In Kulturen boviner Gelenkchondrozyten führt die Zugabe von TGF $\beta$ -2 in Konzentrationen von 0,1 ng/ml und 1 ng/ml zu einer verstärkten Zellteilung, während die Proliferation von 10 ng/ml dieses Faktors gehemmt wurde [25]. Van Susante untersucht die Glykosaminoglykansynthese von bovinen Gelenkchondrozyten in Gegenwart von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 und findet für Konzentrationen von 100 ng/ml, respektive 10 ng/ml maximale Stimulation in serumhaltigen Kulturmedien [143]. Die an die Studie von Yaeger angelehnten Konzentrationen von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 in der vorliegenden Arbeit zeigen im gewählten Kulturmodell keine positive Wirkung. Zur weiteren Optimierung der Kulturbedingungen muss daher, speziell für die Züchtung humanen Septumknorpels, die ideale Konzentration dieser Wachstumsfaktoren weiter untersucht werden.

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Etablierung des Tissue Engineering ist die Untersuchung des in vivo Verhaltens der gezüchteten Gewebe. Mehrere Tiermodelle werden zu diesem Zweck benutzt, wobei sich die subkutane Implantation der Konstrukte in thymusaplastische Nacktmäuse etabliert hat [1, 22, 37, 69, 73, 82, 83,

100, 101, 110, 113, 132]. Im Unterschied zu vielen Studien zum Einsatz von Wachstumsfaktoren wurden die Daten dieser Arbeit überwiegend nach der Explantation aus dem Versuchstier erhoben [17, 20, 28, 45, 66, 84, 94, 102, 130, 137, 140, 141, 143, 152]. Van Susante weist darauf hin, dass die Verhältnisse in vitro nicht auf jene weitaus komplexeren in vivo übertragen werden können [143]. Es ist zu vermuten, dass Konstrukte und Versuchstier durch zum Teil unbekannte zelluläre und humorale Mechanismen miteinander interagieren und dadurch eventuelle Wirkungen von in vitro applizierten Wachstumsfaktoren moduliert werden. Eine Kenntnis dieser Interaktionen zwischen Implantat und Empfänger ist, nicht zuletzt im Hinblick auf den Einsatz des Knorpel Tissue Engineering beim Menschen, von großer Wichtigkeit und muss auch auf biochemisch-molekularer Ebene weiter aufgeklärt werden.

#### **4.5 Wahl des Trägermaterials**

Die zur Herstellung von Knorpeltransplantaten geeigneter Größe nötige Anzahl von Zellen, ist aus einer kleinen Biopsie initial nicht zu erhalten. Daher ist der erste Schritt im Tissue Engineering die Vermehrung der gewonnenen Zellen. Die Monolayer-Kultur stellt hierfür eine geeignete Methode dar [19, 72, 121, 134]. Ein bekanntes Problem bei der Vermehrung von Knorpelzellen in Monolayer ist die sogenannte Dedifferenzierung. In diesem Prozess verlieren die Zellen ihre ursprünglich runde Morphe, werden spindelförmig langgestreckt und sind nicht mehr zur Synthese knorpelspezifischer Produkte wie Kollagen II oder Glykosaminoglykanen fähig [51, 147]. Jedoch ist dieser Prozess bei der Übertragung dieser Zellen in eine dreidimensionale Kulturform reversibel [6]. Beispiele derartiger Kulturformen sind u.a. die Alginat-Gel-Kultur [59, 141], die Agarose-Kultur [6], die Kultur in Kollagen-Gel [23] oder die Verwendung synthetisch hergestellter biodegradierbarer (Co-)Polymer-Strukturen als Zellträger [37, 69, 101, 132]. Letztere haben sich besonders bei in vivo Studien bewährt.

Die Trägerstruktur muss den Chondrozyten stabile Rahmenbedingungen bieten, um eine zweckmäßige räumliche Organisation des zu züchtenden Gewebes und eine ungehinderte Matrixdeposition zu ermöglichen [64]. Die von Chondrozyten neusynthetisierte ECM ist zu Beginn verhältnismäßig instabil und nicht in der Lage ihre dreidimensionale Form selbst beizubehalten [22]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein Vlies aus PDS-verklebten Vicrylfasern (Ethisorb E 210) grundsätzlich zur

Züchtung knorpelartigen Gewebes aus humanen Septum-Chondrozyten verwendet werden kann und bestätigt damit die Erkenntnisse anderer Autoren [56, 83, 96, 110]. Die Vicrylfasern in den benutzten Vliesen werden durch punktuelle Verbindungen aus geschmolzenem PDS stabilisiert (Abb. 2, 3, 4). Diese Fasern zeichnen sich auf Grund ihrer Zusammensetzung aus Glykolat- und Laktatmonomeren durch ein hohes Maß an Gewebeverträglichkeit aus. Der Abbau der Vliesstrukturen in diese Grundbestandteile, die auf physiologischem Wege verwertet werden können, macht sie besonders für den Einsatz in vivo geeignet. Jedoch zeigen Studien von Sittinger und Bujia, dass der Zerfall dieser Trägermaterialien zur Akkumulation von saueren Abbauprodukten und damit zytotoxischen pH-Werten führen kann. Zusätzlich konnte für hohe Dosen von Glykolat ein pH-unabhängiger zytotoxischer Effekt auf Chondrozyten gezeigt werden [18, 122]. Daher muss die Degradation eines Trägermaterials wohl dosiert verlaufen und darf nicht zur schnellen Anhäufung zytotoxischer Abbauprodukte führen. Andererseits zeigen mehrere Autoren negative Effekte von Zellträgern, die eine sehr lange Zerfallsdauer aufweisen, wie beispielsweise Polylaktid-Vliese [37, 109, 110]. Eine Trägerstruktur mit idealer Zerfallskinetik in vitro und in vivo muss dem Konstrukt Stabilität verleihen, bis es durch Zellteilung und Matrixsynthese zu einem mechanisch widerstandsfähigen Gewebe gereift ist und gleichzeitig eine zügige Beseitigung seiner Bestandteile ermöglichen, ohne eine nachteilige Gewebsreaktion zu verursachen.

Die gezielte Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Trägermaterials kann zur weiteren Untersuchung der Degradationskinetik von Ethisorb genutzt werden. Saller folgert, dass die mechanische Stabilität der Vliese vom Gehalt an PDS-Verbindungspunkten beeinflusst wird [116]. Zur Klärung der Frage, in wie weit der Gehalt an PDS, und damit die mechanische und chemische Widerstandskraft der Trägerstrukturen den tissue-engineerten Knorpel beeinflusst, wurde Ethisorb mit Standard und reduziertem Gehalt an PDS verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutliche Unterschiede in der Stabilität der resultierenden Zell-Copolymer-Konstrukte, besonders nach längerer Zeit in vivo (Tabelle 2). Die mechanische und chemische Beanspruchung wird von Vliesen mit Standard PDS-Gehalt deutlich besser toleriert als von PDS-reduziertem Ethisorb. Durch mangelnde Stabilität der formgebenden Trägerstruktur scheint eine geordnete Synthese extrazellulärer Matrix nicht adäquat möglich und führt zu einer erhöhten Resorptionsquote in PDS-reduzierten Vliesen. Ethisorb-Vliese mit verringertem

Gehalt an PDS-Verbindungspunkten sind daher zur Verwendung als Trägerstruktur für Zellen im Rahmen des Knorpel Tissue Engineering wenig geeignet.

## **4.6 Ausblick und Perspektiven**

In Zukunft müssen Wege zur verlässlichen Redifferenzierung von amplifizierten und damit dedifferenzierten humanen Chondrozyten identifiziert und optimiert werden, da nur diese Zellen für den klinischen Gebrauch in Frage kommen. Das schließt auch die weitere Charakterisierung der Wirkung von Wachstumsfaktoren ein, um deren Bedeutung im Rahmen des Tissue Engineering abschätzen zu können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen verschiedener Spender zu Konstrukten von zum Teil deutlich unterschiedlicher Qualität führen, unabhängig von der Applikation von Wachstumsfaktoren. Interindividuelle Unterschiede in der Potenz zur Entwicklung knorpelartiger Konstrukte zeigen sich besonders bei der Untersuchung der extrazellulären Matrix (Abb. 26, 27 und 31, 32). Es ist bekannt, dass das Patientenalter die biochemische Zusammensetzung und die mechanischen Eigenschaften von humanem Septumknorpel beeinflusst [111], jedoch keinen Einfluss auf die Qualität des generierten knorpelartigen Gewebes nach acht Wochen in vivo hat [112]. Es ist aber nicht auszuschließen, dass weitere, noch unbekannte Faktoren für die interindividuell unterschiedlichen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen müssen die Gründe dieser interindividuellen Unterschiede weiter aufklären.

Neben der weiteren Erforschung des Knorpelstoffwechsels ist die Optimierung der Kulturbedingungen anzustreben. Idealerweise sollten diese standardisiert und vergleichbar sein. Dies setzt fast unvermeidbar den Einsatz serumfreier Medien voraus, da Serum mit mehreren Nachteilen behaftet ist. Zum einen ist eine immunologische Reaktion des Empfängers auf Knorpelkonstrukte, die in serumhaltigen Medien gezüchtet wurden, nicht vollständig auszuschließen. Zum anderen besteht bei der Verwendung von Serum grundsätzlich eine Infektionsgefahr mit diversen Erregern. Beide Probleme lassen sich jedoch durch die Verwendung von autologem Serum ausschließen [53]. Ein weiteres Argument gegen den Einsatz serumhaltiger Medien ist deren ungeklärte Zusammensetzung, besonders im Rahmen des Knorpel Tissue Engineering und der Verwendung von Wachstumsfaktoren. Bestandteile des Serums können alle erdenklichen Einflüsse, von Inhibition, über Modulation, bis Stimulation auf die eingesetzten

Wachstumsfaktoren ausüben. Die Gewinnung reproduzierbarer Ergebnisse ist unter diesen Umständen erschwert.

Dynamisches Zell-Seeding, das eine effiziente Besiedelung der Trägerstrukturen mit hohen Zellzahlen ermöglicht [149] und Bioreaktoren, die den Knorpelzellen möglichst natürliche Kulturbedingungen bieten [36, 41], sind vielversprechende Ansätze, um die Methoden des Tissue Engineering weiter zu verfeinern. Eine homogene Besiedlung ist vorteilhaft für die Herstellung qualitativ hochwertiger, gleichmäßig stabiler Knorpelgewebe, da sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakte zur Homöostase dieser Gewebe von Bedeutung sind [97, 107, 136, 140]. Bioreaktoren bieten den Knorpelzellen und dem sich entwickelnden Gewebe günstige Umweltbedingungen und können auch zur mechanischen Stimulation der Konstrukte eingesetzt werden. Mehrere Studien lassen vermuten, dass die Applikation mechanischer Stimulation die Qualität des gezüchteten Knorpelgewebes positiv beeinflusst, und auch die Wirkung von Wachstumsfaktoren moduliert [47, 131].

Die Weiterentwicklung und Verbesserung von Trägerstrukturen wird durch neue Erkenntnisse und Methoden aus der Materialforschung und Verfahrenstechnik ermöglicht. Wünschenswert sind besonders leicht besiedelbare Materialien, die zusätzlich den eingesetzten Zellen möglichst gute Bedingungen zur Ausbildung eines knorpeltypischen Phänotyps bieten. Dies könnte durch den Einsatz natürlicher Matrixbestandteile oder chemisch gebundener Wachstumsfaktoren möglich werden. Weitere entscheidende Materialeigenschaften, wie die Stabilität und Degradationskinetik in vivo sowie die chemische Zusammensetzung, müssen in Zukunft den Bedürfnissen des Tissue Engineering besser angepasst werden. Entsprechend den Umweltbedingungen in vivo, kann dann ein Trägermaterial mit geeigneten chemischen und physikalischen Eigenschaften die Ausprägung erforderlicher Merkmale gezüchteter Gewebes beeinflussen und fördern. Die Entwicklung von Trägerstrukturen, die eine lokale Entzündungsreaktion im Empfängerbett minimieren, kann die Gewebeverträglichkeit und damit letztendlich die Qualität des generierten Konstrukts verbessern. Dies ist für den erfolgreichen Einsatz tissue-engineerter Gewebe als Knorpelersatzmaterial vorteilhaft.

Durch fortschreitende Entwicklung und Verfeinerung der Methoden ist ein baldiger Einsatz tissue-engineerter Gewebe im Rahmen der Kopf-Hals-Chirurgie anzustreben, um die Gültigkeit der Ergebnisse der Untersuchungen am Tiermodell zu überprüfen, bzw. gegebenenfalls entsprechend zu modifizieren. In der Orthopädie wird die

Transplantation autologer Chondrozyten schon unter experimentellen Rahmenbedingungen am Menschen angewendet und zeigt ermutigende Ergebnisse [12, 90]. Jedoch ist Knorpel im Gelenk deutlich unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt als beispielsweise im Nasenseptum. Somit sind die Erkenntnisse aus der Orthopädie nur teilweise auf gezüchtete Knorpelgewebe in der Kopf-Hals-Chirurgie übertragbar. Der klinische Einsatz muss aber weiterhin die größte Zielsetzung der Erforschung des Tissue Engineering bleiben, um das zweifellos vorhandene Potential dieses Verfahrens sinnvoll für den Menschen nutzbar zu machen.

## 5 Zusammenfassung

Hyaliner Knorpel ist ein Gewebe mit geringer Selbstheilungstendenz. Neben der Orthopädie besteht auch in der Kopf-Hals-Chirurgie großer Bedarf an Knorpelgewebe zum Einsatz im Rahmen rekonstruktiver und plastischer Eingriffe. Die gängigen Methoden des Knorpelersatzes umfassen autologe und allogene Knorpeltransplantationen sowie die Verwendung alloplastischer Materialien. Diese Verfahren sind mit einigen Nachteilen, wie Infektionsübertragung und immunologischen Abstoßungsreaktionen, behaftet. Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe aus isolierten Knorpelzellen eines Patienten mit den Methoden des Tissue Engineering stellt eine vielversprechende Alternative zu den genannten Verfahren dar.

Zur Optimierung der Methoden der Knorpelzüchtung wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF $\beta$ -2 auf tissue-engineerten Knorpel nach Kultur in vitro und anschließend in vivo untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss zweier vollresorbierbarer Trägermaterialien – Ethisorb-Vliese mit Standard oder reduziertem Gehalt an PDS – auf das Verhalten der gezüchteten Gewebe in vivo überprüft.

Nach enzymatischer Gewinnung von Einzelzellen aus humanem Septumknorpel wurden diese in Monolayer-Kultur amplifiziert und anschließend auf Ethisorb-Vliese aufgebracht. Unter diesen dreidimensionalen Kulturbedingungen wurden die Wachstumsfaktoren in Kombination als Zusatz zum Kulturmedium verwendet. Die Zell-Copolymer-Konstrukte wurden dann für 4 und 12 Wochen subkutan in homozygote thymusaplastische Nacktmäuse implantiert, um ihr Verhalten in vivo zu untersuchen.

Nach der dreidimensionalen Kultur in vitro und nach 4 bzw. 12 Wochen in vivo wurden die Konstrukte nach ihrem Resorptionsverhalten beurteilt, gewogen, histologisch und biochemisch untersucht. Dabei wurden die Zellzahl sowie der Glykosaminoglykan- und Hydroxyprolinegehalt der Präparate bestimmt.

Die Wachstumsfaktoren hatten in der eingesetzten Konzentration und Kombination sowie unter den verwendeten Kulturbedingungen keinen eindeutig positiven Einfluss auf die gezüchteten Gewebe. Mit Ausnahme des Nassgewichts nach der Kultur in vitro, war keiner der erhobenen Parameter in der Versuchsgruppe signifikant von der Kontrollgruppe verschieden.

Trägermaterialien mit reduziertem Gehalt an PDS führten nach Implantation in das Versuchstier signifikant häufiger zu Resorptionen der Zell-Copolymer-Konstrukte und sind damit zur Züchtung von Knorpelgewebe mit den verwendeten Methoden wenig geeignet. Ethisorb-Vliese mit Standard PDS-Gehalt wurden dagegen als geeignete Zellträger zur Züchtung von Knorpelgewebe bestätigt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass zur Optimierung der Kulturmethode im Tissue Engineering von Knorpel weitere Untersuchungen über den Effekt von Wachstumsfaktoren nötig sind, im Besonderen bei der Verwendung von humanen Septumknorpelzellen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. AREVALO-SILVA, C.A., Y. CAO, M. VACANTI, Y. WENG, C.A. VACANTI und R.D. EAVEY, *Influence of growth factors on tissue-engineered pediatric elastic cartilage*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000. **126**(10): S. 1234-1238.
2. AREVALO-SILVA, C.A., Y. CAO, Y. WENG, M. VACANTI, A. RODRIGUEZ, C.A. VACANTI und R.D. EAVEY, *The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage*. Tissue Eng, 2001. **7**(1): S. 81-88.
3. AULHOUSE, A.L., M. BECK, E. GRIFFEY, J. SANFORD, K. ARDEN, M.A. MACHADO und W.A. HORTON, *Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro*. In Vitro Cell Dev Biol, 1989. **25**(7): S. 659-668.
4. BECKER, W., H.H. NAUMANN und C.R. PFALTZ, *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde*. 1986, Stuttgart: Thieme.
5. BELL, E., *Tissue engineering: a perspective*. J Cell Biochem, 1991. **45**(3): S. 239-241.
6. BENYA, P.D. und J.D. SHAFFER, *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. Cell, 1982. **30**(1): S. 215-224.
7. BERGER, H., C. GARTNER, P. KOHZ, A. STABLER, H. DIENEMANN und E. WILMES, *The implantation of elastic metal endoprostheses in tracheal stenosis and tracheomalacia. The initial results with 4 patients*. Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr, 1993. **159**(1): S. 43-49.
8. BLUNK, T., A.L. SIEMINSKI, K.J. GOOCH, D.L. COURTER, A.P. HOLLANDER, A.M. NAHIR, R. LANGER, G. VUNJAK-NOVAKOVIC und L.E. FREED, *Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage*. Tissue Eng, 2002. **8**(1): S. 73-84.
9. BOS, P.K., G.J. VAN OSCH, D.A. FRENZ, J.A. VERHAAR und H.L. VERWOERD-VERHOEF, *Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit auricular cartilage wound model*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9**(4): S. 382-389.
10. BOTTFNER, M., K. KRIEGLSTEIN und K. UNSICKER, *The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions*. J Neurochem, 2000. **75**(6): S. 2227-2240.
11. BRENNER, J., J. HOLSTE, L. SCHILDER, P. KÖHLER und U. SALLER, *Das resorbierbare Composite-Vlies-Pledget Eine Dokumentation*. 2000, Ethicon GmbH&Co KG: Norderstedt. S. 1-51.
12. BRITTBERG, M., A. LINDAHL, A. NILSSON, C. OHLSSON, O. ISAKSSON und L. PETERSON, *Treatment of deep cartilage defects in the knee with*

- autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): S. 889-895.
13. BRUNNER, F.X., *Implantatmaterialien - was hat sich wo und wann bewährt?* Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl, 1993. **1**: S. 311-336.
  14. BUCHER, O. und H. WARTENBERG, *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12 ed. 1997: Verlag Hans Huber.
  15. BUCKWALTER, J.A., *Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury and Methods of Facilitating Repair*, in *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*, J.W. Ewing, Arthroscopy Association of North America., und B.-M.Z. (Firm), Editors. 1990, Raven Press: New York. S. 15-56.
  16. BUJIA, J., *Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen*. Laryngorhinootologie, 1995. **74**(4): S. 205-210.
  17. BUJIA, J., P. PITZKE, E. KASTENBAUER, E. WILMES und C. HAMMER, *Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal chondrocytes cultured in monolayer and in agar*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1996. **253**(6): S. 336-340.
  18. BUJIA, J., REITZEL und M. SITTINGER, *In-vitro-Züchtung von Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Einfluß von L(+)-Laktat und Glykolat auf kultivierte humane Chondrozyten*. Laryngorhinootologie, 1995. **74**(3): S. 183-187.
  19. BUJIA, J., M. SITTINGER, P. PITZKE, E. WILMES und C. HAMMER, *Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1993. **55**(6): S. 347-351.
  20. BUJIA, J., M. SITTINGER, E. WILMES und C. HAMMER, *Effect of growth factors on cell proliferation by human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer*. Acta Otolaryngol, 1994. **114**(5): S. 539-543.
  21. CAMPBELL, C.J., *The healing of cartilage defects*. Clin Orthop, 1969. **64**: S. 45-63.
  22. CAO, Y., J.P. VACANTI, K.T. PAIGE, J. UPTON und C.A. VACANTI, *Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear*. Plast Reconstr Surg, 1997. **100**(2): S. 297-302; discussion 303-294.
  23. CHAIPINYO, K., B.W. OAKES und M.P. VAN DAMME, *Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels*. J Orthop Res, 2002. **20**(5): S. 1070-1078.

24. DAVIS, A.E., *Homograft materials in otolaryngology: the risk of transmitting human immunodeficiency virus*. Clin Otolaryngol, 1988. **13**(2): S. 159-161.
25. DE HAART, M., W.J. MARIJNISSEN, G.J. VAN OSCH und J.A. VERHAAR, *Optimization of chondrocyte expansion in culture. Effect of TGF beta-2, bFGF and L-ascorbic acid on bovine articular chondrocytes*. Acta Orthop Scand, 1999. **70**(1): S. 55-61.
26. DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HNO-HEILKUNDE, K.-U.H.-C., *Leitlinien der Dt. Ges. f. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Septo-Rhinoplastik [AWMF online - Leitlinie HNO: Septo-Rhinoplastik]; URL: [http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/hno\\_II70.htm](http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/hno_II70.htm)*. 2000.
27. DICKSON, W.A. und T.J. INGLIS, *Cialit preserved cartilage: failure to guarantee sterility*. Br J Plast Surg, 1988. **41**(4): S. 408-409.
28. DUNHAM, B.P. und R.J. KOCH, *Basic fibroblast growth factor and insulinlike growth factor I support the growth of human septal chondrocytes in a serum-free environment*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998. **124**(12): S. 1325-1330.
29. ELISSEEFF, J., W. MCINTOSH, K. FU, B.T. BLUNK und R. LANGER, *Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering*. J Orthop Res, 2001. **19**(6): S. 1098-1104.
30. FARNDALE, R.W., D.J. BUTTLE und A.J. BARRETT, *Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue*. Biochim Biophys Acta, 1986. **883**(2): S. 173-177.
31. FARNDALE, R.W., C.A. SAYERS und A.J. BARRETT, *A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures*. Connect Tissue Res, 1982. **9**(4): S. 247-248.
32. FERRANTE, B., R. BIESSY, V. DUCROZ, D. GZAIEL und P. LEYDER, *Correction of nose deviations using latero-septal grafts from irradiated bovine cartilage*. Ann Chir Plast Esthet, 1993. **38**(5): S. 555-560.
33. FORTHMEYER, H.P., *Thymusaplastische Maus (nu/nu), thymusaplastische Ratte (rnu/rnu): Haltung, Zucht, Versuchsmodelle*. 1981, Berlin und Hamburg: Parey Verlag.
34. FORTIER, L.A., A.J. NIXON, H.O. MOHAMMED und G. LUST, *Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1*. Am J Vet Res, 1997. **58**(1): S. 66-70.
35. FREED, L.E., D.A. GRANDE, Z. LINGBIN, J. EMMANUAL, J.C. MARQUIS und R. LANGER, *Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds*. J Biomed Mater Res, 1994. **28**(8): S. 891-899.

36. FREED, L.E., A.P. HOLLANDER, I. MARTIN, J.R. BARRY, R. LANGER und G. VUNJAK-NOVAKOVIC, *Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system*. Exp Cell Res, 1998. **240**(1): S. 58-65.
37. FREED, L.E., J.C. MARQUIS, A. NOHRIA, J. EMMANUAL, A.G. MIKOS und R. LANGER, *Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers*. J Biomed Mater Res, 1993. **27**(1): S. 11-23.
38. FREED, L.E., J.C. MARQUIS, G. VUNJAK-NOVAKOVIC, J. EMMANUAL und R. LANGER, *Composition of Cell-Polymer Cartilage Implants*. Biotechnology and Bioengineering, 1994. **43**(7): S. 605-614.
39. FREED, L.E. und G. VUNJAK-NOVAKOVIC, *Tissue Engineering of Cartilage*, in *The biomedical engineering handbook*, J.D. Bronzino, Editor. 1995, CRC Press: Boca Raton, Fla., USA. S. 1788-1806.
40. FREED, L.E., G. VUNJAK-NOVAKOVIC, R.J. BIRON, D.B. EAGLES, D.C. LESNOY, S.K. BARLOW und R. LANGER, *Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(7): S. 689-693.
41. FREED, L.E., G. VUNJAK-NOVAKOVIC und R. LANGER, *Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors*. J Cell Biochem, 1993. **51**(3): S. 257-264.
42. FRENKEL, S.R., P.B. SAADEH, B.J. MEHRARA, G.S. CHIN, D.S. STEINBRECH, B. BRENT, G.K. GITTES und M.T. LONGAKER, *Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling*. Plast Reconstr Surg, 2000. **105**(3): S. 980-990.
43. FRISBIE, D.D., E.A. SANDLER, G.W. TROTTER und C.W. MCILWRAITH, *Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-1 in interleukin-1-conditioned equine cartilage*. Am J Vet Res, 2000. **61**(4): S. 436-441.
44. FROGER-GAILLARD, B., P. HOSSENLOPP, M. ADOLPHE und M. BINOUX, *Production of insulin-like growth factors and their binding proteins by rabbit articular chondrocytes: relationships with cell multiplication*. Endocrinology, 1989. **124**(5): S. 2365-2372.
45. GALERA, P., F. REDINI, D. VIVIEN, J. BONAVENTURE, H. PENFORNIS, G. LOYAU und J.P. PUJOL, *Effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process*. Exp Cell Res, 1992. **200**(2): S. 379-392.
46. GIBSON, T., *Cartilage Grafts*, in *Transplantation von Organen und Geweben*, K.E. Seifert und R. Geisendörfer, Editors. 1967, Thieme: Stuttgart. S. 203.
47. GOOCH, K.J., T. BLUNK, D.L. COURTER, A.L. SIEMINSKI, P.M. BURSAC, G. VUNJAK-NOVAKOVIC und L.E. FREED, *IGF-I and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(5): S. 909-915.

48. GOOMER, R.S., T.M. MARIS, R. GELBERMAN, M. BOYER, M. SILVA und D. AMIEL, *Nonviral in vivo gene therapy for tissue engineering of articular cartilage and tendon repair*. Clin Orthop, 2000(379 Suppl): S. S189-200.
49. GOTO, H., F.D. SHULER, C. NIYIBIZI, F.H. FU, P.D. ROBBINS und C.H. EVANS, *Gene therapy for meniscal injury: enhanced synthesis of proteoglycan and collagen by meniscal cells transduced with a TGFbeta(1)gene*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(4): S. 266-271.
50. GRANDE, D.A., A.S. BREITBART, J. MASON, C. PAULINO, J. LASER und R.E. SCHWARTZ, *Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions*. Clin Orthop, 1999(367 Suppl): S. S176-185.
51. GREEN, W.T., JR., *Behavior of articular chondrocytes in cell culture*. Clin Orthop, 1971. **75**: S. 248-260.
52. GRIMAUD, E., D. HEYMANN und F. REDINI, *Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(3): S. 241-257.
53. GRUBER, R., M. SITTINGER und J. BUJIA, *Untersuchungen zur in vitro Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung des möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen-Erkrankungen*. Laryngorhinootologie, 1996. **75**(2): S. 105-108.
54. GUERNE, P.A., A. SUBLET und M. LOTZ, *Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts*. J Cell Physiol, 1994. **158**(3): S. 476-484.
55. HADLOCK, T.A., J.P. VACANTI und M.L. CHENEY, *Tissue engineering in facial plastic and reconstructive surgery*. Facial Plast Surg, 1998. **14**(3): S. 197-203.
56. HAISCH, A., O. SCHULTZ, C. PERKA, V. JAHNKE, G.R. BURMESTER und M. SITTINGER, *Tissue-engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel- und Polymervliesstrukturen*. HNO, 1996. **44**(11): S. 624-629.
57. HAMMER, C. und J. BUJIA, *Immunologie vitaler und konservierter Transplantate*. Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl, 1992. **1**: S. 3-26.
58. HARDINGHAM, T.E., M.T. BAYLISS, V. RAYAN und D.P. NOBLE, *Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage*. Br J Rheumatol, 1992. **31 Suppl 1**: S. 1-6.
59. HAUSELMANN, H.J., M.B. AYDELOTTE, B.L. SCHUMACHER, K.E. KUETTNER, S.H. GITELIS und E.J. THONAR, *Synthesis and turnover of*

- proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads.* Matrix, 1992. **12**(2): S. 116-129.
60. HELLMICH, S., *Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich.* HNO, 1982(30): S. 140-144.
  61. HILL, D.J. und V.K. HAN, *Paracrinology of growth regulation.* J Dev Physiol, 1991. **15**(2): S. 91-104.
  62. HILL, D.J. und A. LOGAN, *Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis.* Prog Growth Factor Res, 1992. **4**(1): S. 45-68.
  63. HUIZING, E.H., I.S. MACKAY und G. RETTINGER, *Reconstruction of the nasal septum and dorsum by cartilage transplants--autogeneic or allogeneic?* Rhinology, 1989. **27**(1): S. 5-10.
  64. HUTMACHER, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.* Biomaterials, 2000. **21**(24): S. 2529-2543.
  65. IGNOTZ, R.A. und J. MASSAGUE, *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix.* J Biol Chem, 1986. **261**(9): S. 4337-4345.
  66. JAKOB, M., O. DEMARTEAU, D. SCHAFER, B. HINTERMANN, W. DICK, M. HEBERER und I. MARTIN, *Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro.* J Cell Biochem, 2001. **81**(2): S. 368-377.
  67. KANGESU, L., T.E. GOODACRE und P.R. STANLEY, *Survival of irradiated glutaraldehyde preserved bovine cartilage in nasal reconstruction: a retrospective study.* Br J Plast Surg, 1991. **44**(7): S. 483-485.
  68. KASTENBAUER, E.R., *Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich.* HNO, 1983. **31**(11): S. 371-380.
  69. KIM, W.S., J.P. VACANTI, L. CIMA, D. MOONEY, J. UPTON, W.C. PUELACHER und C.A. VACANTI, *Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers.* Plast Reconstr Surg, 1994. **94**(2): S. 233-237; discussion 238-240.
  70. KIM, Y.J., R.L. SAH, J.Y. DOONG und A.J. GRODZINSKY, *Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258.* Anal Biochem, 1988. **174**(1): S. 168-176.
  71. KRAFFT, T., W.J. SPITZER und T. BAUER, *Xenogenic cartilage as a transplant for reconstruction of the facial skull.* Fortschr Kiefer Gesichtschir, 1994. **39**: S. 183-186.

72. LANGER, R. und J.P. VACANTI, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): S. 920-926.
73. LEFKOVITZ, I., *The Nude Mouse in Retrospect*. University of Tokyo Press, 1977.
74. LÖFFLER, G. und P. PETRIDES, *Biochemie und Pathobiochemie*. 5 ed. 1997: Springer.
75. LOHMANN, C.H., Z. SCHWARTZ, G.G. NIEDERAUER und B.D. BOYAN, *Der Differenzierungsgrad von Chondrozyten und ihre Vorbehandlung mit "platelet-derived-growth-factor"*. Orthopade, 2000. **29**(2): S. 120-128.
76. LOHMANN, C.H., Z. SCHWARTZ, G.G. NIEDERAUER, D.L. CARNES, JR., D.D. DEAN und B.D. BOYAN, *Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo*. Biomaterials, 2000. **21**(1): S. 49-61.
77. LU, L., X. ZHU, R.G. VALENZUELA, B.L. CURRIER und M.J. YASZEMSKI, *Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering*. Clin Orthop, 2001(391 Suppl): S. S251-270.
78. MACKAY, A.M., S.C. BECK, J.M. MURPHY, F.P. BARRY, C.O. CHICHESTER und M.F. PITTENGER, *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng, 1998. **4**(4): S. 415-428.
79. MALEMUD, C.J., *The role of growth factors in cartilage metabolism*. Rheum Dis Clin North Am, 1993. **19**(3): S. 569-580.
80. MALEMUD, C.J., W. KILLEEN, T.M. HERING und A.F. PURCHIO, *Enhanced sulfated-proteoglycan core protein synthesis by incubation of rabbit chondrocytes with recombinant transforming growth factor-beta 1*. J Cell Physiol, 1991. **149**(1): S. 152-159.
81. MARIJNISSEN, W.J., G.J. VAN OSCH und J. AIGNER, *Construction of a cartilage graft using serially passaged chondrocytes in biodegradable carriers*. Newsletter CRS, 2000: S. 14.
82. MARIJNISSEN, W.J., G.J. VAN OSCH, J. AIGNER, S.W. VAN DER VEEN, A.P. HOLLANDER, H.L. VERWOERD-VERHOEF und J.A. VERHAAR, *Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2002. **23**(6): S. 1511-1517.
83. MARIJNISSEN, W.J., G.J. VAN OSCH, J. AIGNER, H.L. VERWOERD-VERHOEF und J.A. VERHAAR, *Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM)*. Biomaterials, 2000. **21**(6): S. 571-580.

84. MARTIN, I., G. VUNJAK-NOVAKOVIC, J. YANG, R. LANGER und L.E. FREED, *Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue*. Exp Cell Res, 1999. **253**(2): S. 681-688.
85. MIYAZONO, K. und C.H. HELDIN, *Structure, function and possible clinical application of transforming growth factor-beta*. J Dermatol, 1992. **19**(11): S. 644-647.
86. MIYAZONO, K., K. YUKI, F. TAKAKU, C. WERNSTEDT, T. KANZAKI, A. OLOFSSON, U. HELLMAN und C.H. HELDIN, *Latent forms of TGF-beta: structure and biology*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **593**: S. 51-58.
87. NAUMANN, A., N. ROTTER, J. BUJIA und J. AIGNER, *Tissue engineering of autologous cartilage transplants for rhinology*. Am J Rhinol, 1998. **12**(1): S. 59-63.
88. NIXON, A.J., L.A. FORTIER, J. WILLIAMS und H. MOHAMMED, *Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites*. J Orthop Res, 1999. **17**(4): S. 475-487.
89. NOVERRAZ, P.M. und J. RITTERSMA, *Experiences with chondroplast in esthetic facial surgery*. Fortschr Kiefer Gesichtschir, 1989. **34**: S. 100-103.
90. OCHI, M., Y. UCHIO, M. TOBITA und M. KURIWAKA, *Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect*. Artif Organs, 2001. **25**(3): S. 172-179.
91. O'DRISCOLL, S.W. und R.B. SALTER, *The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit*. Clin Orthop, 1986(208): S. 131-140.
92. OKAZAKI, R., A. SAKAI, T. NAKAMURA, N. KUNUGITA, T. NORIMURA und K. SUZUKI, *Effects of transforming growth factor beta s and basic fibroblast growth factor on articular chondrocytes obtained from immobilised rabbit knees*. Ann Rheum Dis, 1996. **55**(3): S. 181-186.
93. PARK, S.S. und M.J. WARD, *Tissue-engineered cartilage for implantation and grafting*. Facial Plast Surg, 1995. **11**(4): S. 278-283.
94. PEI, M., J. SEIDEL, G. VUNJAK-NOVAKOVIC und L.E. FREED, *Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(1): S. 149-154.
95. PELLEGRINI, P., *Use of irradiated bovine cartilage in the correction of defects of the nasal structure*. Acta Otorhinolaryngol Ital, 1990. **10**(5): S. 487-497.

96. PERKA, C., O. SCHULTZ, M. SITTINGER und H. ZIPPEL, *Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen*. Orthopade, 2000. **29**(2): S. 112-119.
97. PFEILSCHIFTER, J., L. BONEWALD und G.R. MUNDY, *Role of Growth Factors in Cartilage and Bone Metabolism*, in *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 95/II, Peptide Growth Factors and their Receptors II*, M.B. Sporn und A.B. Roberts, Editors. 1990.
98. POLLEY, J.W. und S.L. RINGLER, *The use of Teflon in orbital floor reconstruction following blunt facial trauma: a 20-year experience*. Plast Reconstr Surg, 1987. **79**(1): S. 39-43.
99. PROBST, R., G. GEREVERS und H. IRO, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 2000, Stuttgart: Thieme.
100. PUELACHER, W.C., S.W. KIM, J.P. VACANTI, B. SCHLOO, D. MOONEY und C.A. VACANTI, *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**(1): S. 49-53.
101. PUELACHER, W.C., D. MOONEY, R. LANGER, J. UPTON, J.P. VACANTI und C.A. VACANTI, *Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes*. Biomaterials, 1994. **15**(10): S. 774-778.
102. QUATELA, V.C., D.A. SHERRIS und R.N. ROSIER, *The human auricular chondrocyte. Responses to growth factors*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1993. **119**(1): S. 32-37.
103. RECHLER, M.M. und S.P. NISSLEY, *Insulin-like Growth Factors*, in *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 95/I Peptide Growth Factors and their Receptors I*, M.B. Sporn und A.B. Roberts., Editors. 1990.
104. REDINI, F., P. GALERA, A. MAUVIEL, G. LOYAU und J.P. PUJOL, *Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes*. FEBS Lett, 1988. **234**(1): S. 172-176.
105. RIESLE, J., A.P. HOLLANDER, R. LANGER, L.E. FREED und G. VUNJAK-NOVAKOVIC, *Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks*. J Cell Biochem, 1998. **71**(3): S. 313-327.
106. RINDERKNECHT, E. und R.E. HUMBEL, *The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin*. J Biol Chem, 1978. **253**(8): S. 2769-2776.
107. ROBERTS, A.B., B.K. MCCUNE und M.B. SPORN, *TGF-beta: regulation of extracellular matrix*. Kidney Int, 1992. **41**(3): S. 557-559.

108. ROBERTS, A.B. und M.B. SPORN, *The Transforming Growth Factor-betas*, in *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 95/I, Peptide Growth Factors and their Receptors I*, M.B. Sporn und A.B. Roberts, Editors. 1990.
109. ROTTER, N., *Untersuchung zum in-vivo-Verhalten von in vitro gezüchtetem vitalen Transplantatmaterial*, in *Medizinische Fakultät*. 1997, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
110. ROTTER, N., J. AIGNER, A. NAUMANN, H. PLANCK, C. HAMMER, G. BURMESTER und M. SITTINGER, *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**(3): S. 347-356.
111. ROTTER, N., L.J. BONASSAR, G. TOBIAS, M. LEBL, A.K. ROY und C.A. VACANTI, *Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. **127**(10): S. 1248-1252.
112. ROTTER, N., L.J. BONASSAR, G. TOBIAS, M. LEBL, A.K. ROY und C.A. VACANTI, *Age dependence of biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered human septal cartilage*. Biomaterials, 2002. **23**(15): S. 3087-3094.
113. ROTTER, N., M. SITTINGER, C. HAMMER, J. BUJIA und E. KASTENBAUER, *Transplantation in vitro hergestellter Knorpelmaterialien: Charakterisierung der Matrixsynthese*. Laryngorhinootologie, 1997. **76**(4): S. 241-247.
114. ROTTER, N., G. TOBIAS, M. LEBL, A.K. ROY, M.C. HANSEN, C.A. VACANTI und L.J. BONASSAR, *Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage*. Arch Biochem Biophys, 2002. **403**(1): S. 132-140.
115. RUDERT, M., C.J. WIRTH, M. SCHULZE und G. REISS, *Synthesis of articular cartilage-like tissue in vitro*. Arch Orthop Trauma Surg, 1998. **117**(3): S. 141-146.
116. SALLER, U. und J. HOLSTE, *Ethisorb - ein neues resorbierbares Implantat für die Chirurgie*. Ethicom OP Forum, 1991(148): S. 1-15.
117. SATO, A., S. NISHIMURA, T. OHKUBO, Y. KYOGOKU, S. KOYAMA, M. KOBAYASHI, T. YASUDA und Y. KOBAYASHI, *Three-dimensional structure of human insulin-like growth factor-I (IGF-I) determined by 1H-NMR and distance geometry*. Int J Pept Protein Res, 1993. **41**(5): S. 433-440.
118. SCHMID, C., *Insulin-like growth factors*. Cell Biol Int, 1995. **19**(5): S. 445-457.
119. SEYEDIN, S.M., T.C. THOMAS, A.Y. THOMPSON, D.M. ROSEN und K.A. PIEZ, *Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(8): S. 2267-2271.

120. SITTINGER, M., J. BUJIA, W.W. MINUTH, C. HAMMER und G.R. BURMESTER, *Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture*. Biomaterials, 1994. **15**(6): S. 451-456.
121. SITTINGER, M., J. BUJIA, N. ROTTER, D. REITZEL, W.W. MINUTH und G.R. BURMESTER, *Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques*. Biomaterials, 1996. **17**(3): S. 237-242.
122. SITTINGER, M., D. REITZEL, M. DAUNER, H. HIERLEMANN, C. HAMMER, E. KASTENBAUER, H. PLANCK, G.R. BURMESTER und J. BUJIA, *Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes*. J Biomed Mater Res, 1996. **33**(2): S. 57-63.
123. SKALAK, R. und C.F. FOX, *Tissue Engineering*, in *Tissue Engineering*, R. Skalak und C.F. Fox, Editors. 1988, Liss, A. R.: New York.
124. SMITH, P., F.D. SHULER, H.I. GEORGESCU, S.C. GHIVIZZANI, B. JOHNSTONE, C. NIYIBIZI, P.D. ROBBINS und C.H. EVANS, *Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(5): S. 1156-1164.
125. SPORN, M.B. und A.B. ROBERTS, *The Transforming Growth Factor-Betas: Past Present and Future*, in *Annals of the New York Academy of Sciences, Transforming Growth Factors-betas, Chemistry, Biology, and Therapeutics*, K.A. Piez und M.B. Sporn, Editors. 1990, New York Academy of Sciences: New York. S. 1-6.
126. STEGEMANN, H. und K. STALDER, *Determination of hydroxyproline*. Clin Chim Acta, 1967. **18**(2): S. 267-273.
127. TEMENOFF, J.S. und A.G. MIKOS, *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(5): S. 431-440.
128. TRIPPEL, S.B., *Growth factor actions on articular cartilage*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: S. 129-132.
129. TRIPPEL, S.B., *Growth factors as therapeutic agents*. Instr Course Lect, 1997. **46**: S. 473-476.
130. TSUKAZAKI, T., T. USA, T. MATSUMOTO, H. ENOMOTO, A. OHTSURU, H. NAMBA, K. IWASAKI und S. YAMASHITA, *Effect of transforming growth factor-beta on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes*. Exp Cell Res, 1994. **215**(1): S. 9-16.
131. TUNG, S.-F., *Effects of Dynamic and Static Mechanical Compression on Chondrocyte Metabolism of Aggrecan and type II Collagen*. b u g - j o u r n a l, 2000. **3**: S. 123-127.

132. VACANTI, C.A., R. LANGER, B. SCHLOO und J.P. VACANTI, *Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation*. *Plast Reconstr Surg*, 1991. **88**(5): S. 753-759.
133. VACANTI, C.A. und J.P. VACANTI, *Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches*. *Otolaryngol Clin North Am*, 1994. **27**(1): S. 263-276.
134. VACANTI, C.A. und J.P. VACANTI, *The science of tissue engineering*. *Orthop Clin North Am*, 2000. **31**(3): S. 351-356.
135. VAN DER KRAAN, P., E. VITTERS und W. VAN DEN BERG, *Differential effect of transforming growth factor beta on freshly isolated and cultured articular chondrocytes*. *J Rheumatol*, 1992. **19**(1): S. 140-145.
136. VAN DER KRAAN, P.M., P. BUMA, T. VAN KUPPEVELT und W.B. VAN DEN BERG, *Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(8): S. 631-637.
137. VAN DER KRAAN, P.M., E.L. VITTERS und W.B. VAN DEN BERG, *Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta in anatomically intact articular cartilage of murine patellae*. *Ann Rheum Dis*, 1992. **51**(5): S. 643-647.
138. VAN OSCH, G.J., E.W. MANDL, W.J. MARIJNISSEN, S.W. VAN DER VEEN, H.L. VERWOERD-VERHOEF und J.A. VERHAAR, *Growth factors in cartilage tissue engineering*. *Biorheology*, 2002. **39**(1-2): S. 215-220.
139. VAN OSCH, G.J., W.J. MARIJNISSEN, S.W. VAN DER VEEN und H.L. VERWOERD-VERHOEF, *The potency of culture-expanded nasal septum chondrocytes for tissue engineering of cartilage*. *Am J Rhinol*, 2001. **15**(3): S. 187-192.
140. VAN OSCH, G.J., W.B. VAN DEN BERG, E.B. HUNZIKER und H.J. HAUSELMANN, *Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998. **6**(3): S. 187-195.
141. VAN OSCH, G.J., S.W. VAN DER VEEN, P. BUMA und H.L. VERWOERD-VERHOEF, *Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix*. *Matrix Biol*, 1998. **17**(6): S. 413-424.
142. VAN OSCH, G.J., S.W. VAN DER VEEN und H.L. VERWOERD-VERHOEF, *In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction*. *Plast Reconstr Surg*, 2001. **107**(2): S. 433-440.

143. VAN SUSANTE, J.L., P. BUMA, H.M. VAN BEUNINGEN, W.B. VAN DEN BERG und R.P. VETH, *Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations*. J Orthop Res, 2000. **18**(1): S. 68-77.
144. VERBRUGGEN, G., E.M. VEYS, N. WIEME, A.M. MALFAIT, L. GIJSELBRECHT, J. NIMMEGEERS, K.F. ALMQUIST und C. BRODDELEZ, *The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentrations of agarose*. Clin Exp Rheumatol, 1990. **8**(4): S. 371-378.
145. VERWOERD-VERHOEF, H.L., P.G. TEN KOPPEL, G.J. VAN OSCH, C.A. MEEUWIS und C.D. VERWOERD, *Wound healing of cartilage structures in the head and neck region*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 1998. **43**(3): S. 241-251.
146. VIVIEN, D., P. GALERA, G. LOYAU und J.P. PUJOL, *Differential response of cultured rabbit articular chondrocytes (RAC) to transforming growth factor beta (TGF-beta)-evidence for a role of serum factors*. Eur J Cell Biol, 1991. **54**(2): S. 217-223.
147. VON DER MARK, K., V. GAUSS, H. VON DER MARK und P. MULLER, *Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture*. Nature, 1977. **267**(5611): S. 531-532.
148. VUNJAK-NOVAKOVIC, G. und L.E. FREED, *Culture of organized cell communities*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **33**(1-2): S. 15-30.
149. VUNJAK-NOVAKOVIC, G., B. OBRADOVIC, I. MARTIN, P.M. BURSAC, R. LANGER und L.E. FREED, *Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering*. Biotechnol Prog, 1998. **14**(2): S. 193-202.
150. WATT, F.M., *Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture*. J Cell Sci, 1988. **89** ( Pt 3): S. 373-378.
151. WOESSNER, J.F., *The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961. **93**: S. 440-447.
152. YAEGER, P.C., T.L. MASI, J.L. DE ORTIZ, F. BINETTE, R. TUBO und J.M. MCPHERSON, *Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes*. Exp Cell Res, 1997. **237**(2): S. 318-325.
153. ZAPF, J. und E.R. FROESCH, *Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role*. Horm Res, 1986. **24**(2-3): S. 121-130.

154. ZIMBER, M. und B. TONG, *TGF-beta Promotes the Growth of Bovine Chondrocytes in Monolayer Culture and the Formation of Cartilage Tissue on Three-Dimensional Scaffolds*. *Tissue Eng*, 1995. **1**(3): S. 289-301.

## 7 Lebenslauf

### Daniel Skodacek

- 05.12.1976** geboren in München,  
Mutter: Veronika Skodacek, Hausfrau  
Vater: Ivan Skodacek, selbstständiger  
Unternehmensberater
- 1983 - 1987** Grundschule am Gernerplatz in Puchheim
- 1987 - 1996** Gymnasium Puchheim
- Juni 1996** Abitur
- 1996 – 1997** Ableistung der Wehrpflicht in der Sanitätsakademie der  
Bundeswehr in München
- 1997** Beginn des Studiums der Humanmedizin in München an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1999** Ärztliche Vorprüfung
- 2000** Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2002** Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2004** Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Abschluss des Medizinstudiums

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Kastenbauer für die Überlassung des interessanten Themas und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der HNO-Forschung.

Frau Dr. med. N. Rotter gilt mein spezieller Dank für die ständige kompetente Betreuung dieser experimentellen Untersuchung und ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld.

In Fragen zu Zellkulturtechniken stand mir Frau Katrin Lempart stets hilfreich zur Seite, wofür ich mich hiermit ausdrücklich bedanken möchte.

Herrn Darko Libl und Frau Brigitte Mack danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate und Färbungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Tissue Engineering“ gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre unter der diese Arbeit entstanden ist. Insbesondere möchte ich mich für die ausdauernde Hilfestellung und fruchtbare Unterstützung bei allen auftretenden Problemen bedanken.