

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
(Direktor: Professor Dr. med. Ernst Kastenbauer)
in Zusammenarbeit mit dem Institut für Chirurgische Forschung
(Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zum Verhalten gezüchteter humaner Knorpeltransplantate
(in vitro und in vivo) auf einem Biomaterial
auf der Basis von Hyaluronsäure**

Eine experimentelle Untersuchung

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

vorgelegt von
Julia Anne Tegeler
aus
München
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Kastenbauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Bartels
Prof. Dr. M. Schleicher
Priv. Doz. Dr. C. de Wit

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. R. Staudenmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2002

Gewidmet meinen Eltern
in Dankbarkeit für ihre
immerwährende liebevolle Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	9
1.1	Konventionelle Möglichkeiten des Knorpelersatzes	10
1.1.1	Alloplastische Implantate	10
1.1.2	Xenogene Transplantate	10
1.1.3	Allogene Transplantate	11
1.1.4	Autologe Transplantate	12
1.2	Tissue-Engineering	13
1.2.1	Periost- und Perichondrium	15
1.2.2	Mesenchymale Stammzellen	16
1.2.3	Differenzierte Chondrozyten	17
1.2.4	Trägermaterialien	18
1.2.5	Hyaluronsäure	20
1.3	Ziel der Studie	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Biomaterial	25
2.2	Gewinnung des Knorpelgewebes	28
2.3	Chondrozytenisolierung	28
2.4	Zellkulturtechniken	29
2.4.1	Amplifizierung in der Monolayerkultur	29
2.4.2	Dreidimensionale Zellkultur in vitro	30
2.5	Tiermodell	31
2.6	Untersuchungen zum Transplantataufbau	33
2.6.1	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung	33
2.6.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	33
2.6.2.1	Untersuchung der Vitalität in der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie	34
2.6.2.2	Darstellung von Kollagen Typ I und II in der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie	35
2.7	Kryokonservierung der Proben und Anfertigung von Gefrierschnitten	35

2.8	Histochemie	36
2.8.1	Hämatoxylin-Färbung	36
2.8.2	Azanfärbung	36
2.8.3	Kernechtrot-Kombinationsfärbung	37
2.8.4	Safranin O-Färbung	38
2.8.5	Alcianblaufärbung	38
2.9	Immunhistochemie	39
2.9.1	Primär-Antikörper	39
2.9.1.1	Kollagen Typ II	39
2.9.1.2	Kollagen Typ I	40
2.9.1.3	Chondroitinsulfat	40
2.9.1.4	Keratansulfat	40
2.9.2	Detektionssysteme	41
2.9.2.1	Indirekte Peroxidasemethode	41
2.9.2.2	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase	42
2.9.2.3	Fluochrome	43
2.10	Liste der verwendeten Materialien	44
3	Ergebnisse	49
3.1	Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur	49
3.1.1	Chondrozytenisolierung und Vermehrung	49
3.1.2	Untersuchungen zur Stabilität des Chondrozytenphänotyps	52
3.1.2.1	Änderungen der Zellmorphologie	52
3.1.2.2	Änderungen des Expressionsmusters	53
3.2	Entwicklung der Transplantate in vitro	56
3.2.1	Zelladhäsion und Stabilität des Trägermaterials	56
3.2.2	Vitalität und Vermehrungsverhalten der Chondrozyten in Hyaff®11	57
3.2.3	Morphologie der Zellen	60
3.2.4	Charakterisierung des Chondrozytenphänotypes	61
3.2.4.1	Allgemeiner Nachweis von Kollagenen	62
3.2.4.2	Kollagen Typ II	63
3.2.4.3	Kollagen Typ I	68
3.2.4.4	Chondroitinsulfat	69
3.2.4.5	Keratansulfat	70

3.2.4.6	Safranin-O	70
3.2.4.7	Alcianblau	70
3.3	Chondrozyten-Hyaff®11-Transplantate in vivo	70
3.3.1	Untersuchung der Stabilität der Transplantate	70
3.3.2	Morphologie der Chondrozyten	71
3.3.3	Allgemeiner Nachweis von Kollagenen	73
3.3.4	Kollagen Typ II	78
3.3.5	Kollagen Typ I	82
3.3.6	Chondroitinsulfat	84
3.3.7	Keratansulfat	85
3.3.8	Safranin O	86
3.3.9	Alcianblau	87
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	88
4	Diskussion	90
4.1	Differenzierungsverhalten von Chondrozyten in der Amplifikationsphase	90
4.2	Beurteilung des entstandenen Gewebe	92
4.2.1	Die Entwicklung der Hyaff®11-Chondrozyten- Transplantate in vitro	92
4.2.2	Die Entwicklung der Hyaff®11-Chondrozyten- Transplantate in vivo	93
4.3	Eignung von Hyaff®11 für das Tissue-Engineering von Knorpelgewebe	95
5	Zusammenfassung und kritische Beurteilung	100
6	Danksagung	101
7	Literaturverzeichnis	103
8	Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APAAP	Alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
ca.	circa
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco`s Medium
DNase	Desoxyribonuklease
EP	Einzelpatient
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
k	Kilo
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
p.a.	per absolutum

PBS	phosphat buffered solution
POX	indirekte Peroxidase-Methode
Rad	radiation absorbed dose
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
TBS	tris base solution
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung und Problemstellung

In der Medizin gibt es in den verschiedenen Bereichen einen großen Bedarf, Knorpelgewebe zu ersetzen. Bei einer Vielzahl von Gelenkerkrankungen, Tumorerkrankungen und nach Traumata besteht ein Knorpeldefizit.

Dies ist zu einem großen Teil durch die geringe Regenerationsfähigkeit des Knorpels bedingt. Knorpelgewebe hat nur sehr wenig Potential, eine Heilung herbeizuführen [Buckwalter 1990, Barone 1996]. Eine Regeneration kann vom Perichondrium oder Periost in begrenztem Ausmaß ausgehen, das bei Läsionen oder chronisch-entzündlichen Prozessen schnell überschritten wird. Ein Wachstum mit einer Vermehrung der Zellen wie in der Embryonalentwicklung ist im Adulten nicht möglich [Leonhardt 1990].

Nach einer Zerstörung von Knorpelgewebe kommt es daher meist zu einer Bildung von Narbengewebe als Ersatzgewebe. Dieses Gewebe ist der funktionellen Aufgabe nicht gewachsen [Leonhardt 1990]. Deformierung, Funktionsverlust und Schmerzen sind die Folge. Es ist dann notwendig, durch ein Implantat oder Transplantat Ersatz zu schaffen.

Die wesentlichen Aufgaben eines Transplantates im Kopf-Hals-Bereich sind Defektauffüllung und mechanische Abstützung. Der Erfolg einer Transplantation oder Implantation wird bestimmt von der Einheilung und Formbeständigkeit bzw. Widerstandsfähigkeit gegen mechanische Beanspruchung sowie der Dauerhaftigkeit des erzielten Resultates [Hammer 1992, Hutmacher 2000]. Das kosmetische Ergebnis stellt ein zusätzliches Problem dar [Kastenbauer 1983]. Die zum Teil schweren funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen können zu einer erheblichen Minderung der Lebensqualität führen.

1.1 Konventionelle Möglichkeiten des Knorpelersatzes

Bislang stehen in der Medizin unterschiedliche Möglichkeiten zum Ersatz von Gewebe und insbesondere von Knorpelgewebe zur Verfügung. Diese umfassen alloplastische Implantate sowie Transplantate unterschiedlicher Herkunft.

1.1.1 Alloplastische Implantate

Alloplastische Implantate sind anorganische Materialien, die in einen Organismus implantiert werden können. Beispiele hierfür sind Gelenkprothesen in der Orthopädie oder der Stützgewebeersatz in der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie mit Trikalziumphosphatkeramiken, z.B. die Münchner Nasenimplantate oder Aluminiumoxidkeramikspangen für den Trachealersatz [Hammer 1992].

Bei der Implantation von Fremdmaterialien in den Körper ist grundsätzlich eine Reihe von Nachteilen gegeben. Es besteht die Gefahr einer primären und sekundären mykotischen oder bakteriellen Besiedelung. Fremdkörperreaktionen des Organismus mit Ausbildung einer Kapselbildung oder Extrusion des Implantates können auftreten. Materialermüdungen mit Zerstörung der Form oder Freisetzung toxischer Stoffe sind möglich. All dies kann zu einem Verlust des Implantates oder Sekundär-morbidität führen. [Kastenbauer 1982, Hammer 1992]. Zudem ist die biomechanische Beschaffenheit der nativer Gewebe nicht gleichwertig.

1.1.2 Xenogene Transplantate

Xenogene (heterologe) Transplantate stammen aus Individuen einer fremden Spezies. Zum Knorpelersatz wird vor allem konservierter, avitaler Knorpel aus dem Schwein oder Rind verwendet. Die antigenen Eigenschaften der Transplantate können durch Konservierung mit Glutaraldehyd und Beta-Strahlen wesentlich reduziert werden. Die Resorptionserscheinungen und Infektionsrate sind jedoch weiterhin

Einleitung und Problemstellung

hoch und können in der Folge zu einer Zerstörung des Transplantates führen [Gibson 1955, Rotter 1996]. Daher werden diese Transplantate klinisch zunehmend seltener eingesetzt. Insbesondere ist in diesem Zusammenhang auch auf eine mögliche Infektion mit Prionen (bovine spongiforme Enzephalopathie) oder andere, bisher noch unbekannte Infektionen hinzuweisen [Tange 1990].

1.1.3 Allogene Transplantate

Ein allogenes (homologes) Transplantat stammt aus einem anderen Individuum der gleichen Spezies. Dies entspricht der heute üblichen Situation einer Organspende.

Unverträglichkeitsreaktionen und Infektionen mit völligem Verlust des Transplantats sind die Hauptprobleme bei der allogenen Transplantation. Im Kopf-Hals-Bereich stellen mögliche Teilresorptionen und sekundäre Deviationen des verpflanzten Gewebes, die das gewünschte funktionelle und kosmetische Ergebnis beeinträchtigen, ein zusätzliches Problem dar [Hammer 1992].

Im Gegensatz zu anderen Geweben löst Knorpelgewebe nur geringe Abwehrreaktionen aus, es wird daher auch als "immunologisch privilegiertes" Gewebe bezeichnet [Gibson 1967]. Dies wird auf eine fehlende Vaskularisierung des Gewebes und auf die Schutzfunktion der Matrix zurückgeführt. Die auf der Zelloberfläche gelegenen Antigene der Chondrozyten sind durch Einbettung in die Matrix dem Zugriff der Abwehrzellen entzogen. Dennoch werden diese zumindest an den Schnittkanten und in Autolysebezirken freigelegt und können eine Immunreaktion auslösen [Alsalameh 1990, Bujia 1992, Pitzke 1994].

Die Bestandteile der Knorpelmatrix wie Chondroitinsulfat, Proteoglykane und Kollagene gelten nicht als antigen [Westhues 1970, Yablon 1982].

Bei der Übertragung von Fremdgeweben besteht trotz sorgfältigem Screening der Spender auf Infektionskrankheiten ein Restrisiko einer Übertragung z.B. des huma-

Einleitung und Problemstellung

nen Immundefizienz Virus (HIV), von Hepatitis B und C, der atypischen Creutzfeld-Jakob-Enzephalopathie oder von anderen viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten [Starke 1990, Tange 1990].

Eine Konservierung des allogenen Transplantates muß daher neben der Reduktion der potentiellen Antigenität die Sterilität des Transplantates garantieren. Mit den heute üblichen Verfahren der Konservierung mit Cialit und Merthiolat scheint eine totale Elimination der Klasse-II-Antigene gewährleistet zu sein, nicht jedoch eine ausreichende Sterilität [Bujia 1990, Hammer 1992, Bujia 1994].

Ein wichtiges zusätzliches Problem ergibt sich aus der Tatsache, daß die Konservierung zu einer vollständigen Devitalisierung des Gewebes führt [Hammer 1992]. Einige der Resorptionsphänomene werden auf eine schlechte Konservierung des Transplantats zurückgeführt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der nachgewiesenen Antigenität des Perichondriums, das eine Immunantwort gegen das allogene Transplantat hervorrufen kann [Bujia 1990b].

1.1.4 Autologe Transplantate

Bei dieser Form des Gewebeersatzes stammen die Transplantate aus dem jeweiligen Individuum selbst. Die Risiken einer Transplantatabstoßung oder übertragbarer Infektionskrankheiten entfallen praktisch völlig [Osch 2000]. Dies ist in der Kopf-Hals-Chirurgie das am häufigsten verwendete Verfahren.

Zur Transplantatgewinnung wird Knorpelgewebe in der benötigten Größe von einer anderen Stelle des Körpers entnommen, z.B. Rippen- oder Ohrknorpel für die Nasen- oder Ohrrekonstruktion. In der Regel wird körpereigener Knorpel ohne Umbaumechanismen integriert. Die körpereigenen Transplantate weisen nur geringe Resorptionserscheinungen sowie eine bleibende Transplantatvitalität auf [Hammer 1992].

Einleitung und Problemstellung

Dennoch hat auch diese Methode eine Reihe von Nachteilen. Prinzipiell sind nur wenige Areale für eine Spende geeignet. Es besteht eine zusätzliche intraoperative und postoperative Hebedefektmorbidität [Osch 2001]. Organe der Nachbarschaft können verletzt werden. Zusätzliche Narben entstehen und es können Wundheilungsstörungen auftreten. Bei der Transplantation von Ohrknorpel z.B. kann eine Superinfektion auf der Spenderseite zu einer Einschmelzung des Restknorpelgewebes mit Deformität führen. Zudem kann körpereigenes Gewebe nur begrenzt entnommen werden, ohne einen störenden Defekt an der Entnahmestelle zu setzen.

Auch bei der autologen Knorpeltransplantation können Resorptionserscheinungen beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wird die Beteiligung von immunologischen Reaktionen diskutiert, die im Rahmen von bereits vorliegenden Autoimmunerkrankungen entstanden sind [Bujia 1990, Bujia 1993].

1.2 Tissue-Engineering

Ein völlig anderer Ansatz für den autologen Knorpelersatz ist das Tissue-Engineering. Durch die Verwendung lebender Zellen und Komponenten der Extrazellulärmatrix oder synthetischer Materialien wird versucht, defekte Gewebefunktionen zu ersetzen, aufrecht zu erhalten oder zu verbessern. Hierfür werden die Techniken der Ingenieurwissenschaften mit denen der Biowissenschaften verbunden [Skalak 1988].

Auch für den Knorpelersatz lassen sich diese Methoden nutzen. Diese stellen eine interessante Möglichkeit in der Medizin sowie der Forschung dar [Patrick 1998, Hutmacher 2000]. Für die Rekonstruktive Chirurgie könnte es ein vielversprechendes Verfahren werden, um größere Knorpeldefekte mit einer minimalen Hebedefektmorbidität zu ersetzen [Aigner 2000].

Einleitung und Problemstellung

Es werden aus körpereigenen Zellen Gewebe für den Defekt gezüchtet, wie es z.B. für den Hautersatz bei Verbrennungsoptionen und chronische Wunden [Itin 1990, Sabolinski 1996, Zacchi 1998] oder auch für die in vitro-Herstellung endothelisierter Gefäßprothesen [Zilla 1989] bereits klinisch angewendet wird.

Für das Tissue-Engineering werden lebende Zellen verwendet, die nach einer Vermehrungsphase in eine neue, dreidimensionale Anordnung gebracht werden. Häufig ist hierfür die Verwendung eines Trägermaterials notwendig. Die spezielle Problematik bei der Züchtung von Knorpelgewebe besteht in der Erzeugung einer funktionstüchtigen extrazellulären Matrix, die je nach Knorpelart (Faserknorpel, hyaliner oder elastischer Knorpel) eine spezifische Zusammensetzung hat. Die Hauptbestandteile sind das Kollagen Typ II und Proteoglykane, die jeweils ca. 42% der Trockensubstanz ausmachen [Leonhardt 1990, Chen 1995]. Ca. 7% bestehen aus wasserunlöslichen Eiweißen. Weiter finden sich in geringen Mengen Minor-Kollagene Typ III, VI, IX und XI [Bossier 1990].

Nicht nachweisbar ist Kollagen Typ I, das ausschließlich in den allgemeinen Bindegeweben zu finden ist.

Diese Zusammensetzung und Binnenarchitektur ist eine wichtige Voraussetzung für die einzigartigen mechanischen und druckelastischen Eigenschaften von Knorpelgewebe, das hohen Drücken und Scherkräften gleichermaßen standhalten können muß [Stading 1999]. Hyaliner Knorpel beispielsweise hat eine Druckfestigkeit von ca. 1,5 kg/mm², Knochen als druckfestestes Gewebe im Körper 15 kg/mm², allgemeine Bindegewebe liegen mit 0,06 kg/mm² deutlich darunter [Leonhardt 1990].

Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen sowohl in der Wahl der Zellen als auch der Fülle von Biomaterialien, die als Trägermaterialien zur Verfügung stehen. Weitere Eingriffsmöglichkeiten bieten die Verwendung von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren sowie genetische Ansätze zur Verbesserung der Ergebnisse. Die we-

Einleitung und Problemstellung

sentlichen Methoden, Zellen und Trägermaterialien werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

1.2.1 Periost- und Perichondrium

Hier werden die physiologischen Möglichkeiten von Periost und Perichondrium genutzt. Die Fähigkeiten von Periost und Perichondrium, Knorpel zu bilden, sind schon lange bekannt [Cohen 1995, Homminga 1990].

Dies findet Anwendung bei Knorpeldefekten in Gelenken. Ein Periost- oder Perichondriumlappen wird direkt in den Defekt transplantiert. Über die Ausbildung von Chondroblasten entsteht in der Folge Knorpelgewebe [Cohen 1995]. Selbst große Defekte können so gedeckt werden.

Das neugebildete Gewebe geht jedoch keine stabile Verbindung mit dem umgebenden Knorpelgewebe ein, die Oberfläche ist nicht glatt [Mow 1991]. Zudem neigt das zunächst gebildete, hyalinartige Gewebe im Lauf der Zeit zu einer Kalzifizierung und kann durch enchondrale Ossifikation zu Knochen umgebaut werden [Homminga 1990, Ritsula 1994]. Die Folge ist eine Einschränkung der Gelenkfunktion ähnlich einer Arthrose.

Ein weiteres neues Verfahren besteht in der Kombination eines Periostlappens mit einer Chondrozytensuspension zur Defektauffüllung bei tiefen Knorpeldefekten im Kniegelenk [Brittberg 1994]. Die Chondrozytengewinnung erfolgte durch Isolierung aus nicht belasteten Arealen des Gelenkknorpels, wobei die Zellen ohne weitere Kultivierung reimplantiert wurden.

Die ersten klinischen Ergebnisse ergaben gute funktionelle Ergebnisse. Einschränkend muß allerdings angeführt werden, daß die untersuchten Patienten jung waren und die Defekte aufgrund einer Sportverletzung und nicht durch eine chronische Erkrankung aufgetreten waren. Zudem lassen sich nur kleinere, umschriebene

Einleitung und Problemstellung

Knorpeldefekte mit einer Chondrozytensuspension füllen und das Transplantatlager muß gut abgrenzbar sein.

Neuere Studien beschäftigen sich mit der Kultivierung von Perichondrozyten zur Nutzung der Progenitorzellen. In Kombination mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie z.B. insulin-like growth factor (IGF-1) oder transforming growth factor beta 2 (TGF β 2) sind die Ergebnisse bislang vielversprechend. Die Bildung matrixtypischer Bestandteile wie Kollagen Typ II oder Glycosaminoglycane konnte in vitro nachgewiesen werden [Klein-Nulend 1998, Osch 2000].

1.2.2 Mesenchymale Stammzellen

Pluripotente, mesenchymale Stammzellen sind Vorläuferzellen, die sich in Zellen unterschiedlicher Gewebe, z.B. Chondrozyten oder Osteozyten differenzieren können.

Die Zellen werden aus dem Knochenmark, Blut oder Fettgewebe gewonnen, kultiviert und können auf Trägermaterialien transplantiert werden. Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei Kultivierung der Stammzellen eine Differenzierung zu Chondrozyten erreicht werden kann. Diese exprimieren knorpeltypische Matrixbestandteile [Im 2001].

Es gibt jedoch experimentelle Hinweise darauf, daß nach einer anfänglichen Bildung von Knorpelgewebe eine Ossifikation in erheblichem Ausmaß eintreten kann [Bruder 1998, Wakitani 1994]. Dies geht mit einem Funktionsverlust des Gewebes einher. Möglicherweise kann dies durch Zugabe von Differenzierungsfaktoren wie TGF- β 3 verhindert bzw. reduziert werden [Ponticiello 2000].

1.2.3 Differenzierte Chondrozyten

Eine weiteres verbreitetes Verfahren besteht in der Verwendung differenzierter Chondrozyten, die durch enzymatische Isolierung aus einer Knorpelbiopsie gewonnen werden können. Zur Züchtung von größeren Transplantaten müssen diese Zellen zu einer ausreichenden Zellzahl vermehrt werden [Aigner 1998].

Der adulte Chondrozyt im nativen Gewebe bzw. Zellverband besitzt kaum Teilungsfähigkeit. Die isolierten Chondrozyten können erneut proliferieren, verlieren aber während der Amplifizierung die spezifischen Eigenschaften im Sinne eines Verlustes der Matrixproduktion zugunsten der niederen Funktion der Teilungsfähigkeit. Der damit auftretende Verlust des knorpelspezifischen Phänotyps wird im allgemeinen als Dedifferenzierung bezeichnet [Desmukh 1976, Benya 1978].

Es tritt ein sogenannter Switch einer Kollagen Produktion von Typ II zu Typ I und III sowie Fibronectin auf. Zugleich ist eine Änderung der Zellmorphologie zu beobachten. Die normalerweise rund-ovalen Chondrozyten erhalten eine spindelförmige Zellmorphologie ähnlich der von Fibroblasten [Layman 1972, Mark 1977].

Daher stellt das wichtigste Problem nach Gewinnung einer ausreichenden Zellzahl die Induktion einer Redifferenzierung mit erneuter Matrixproduktion und Wiedererlangung der Morphologie dar. Die Redifferenzierung ist zwingend notwendig, damit eine spezifische Matrix mit den einzigartigen mechanischen Qualitäten von Knorpelgewebe entstehen kann [Benya 1978].

1982 wurde erstmals die Redifferenzierung von Kaninchenchondrozyten in vitro beschrieben, die nach einer Kultivierungszeit von 2 Wochen im Agarosegel auftrat [Benya 1982, Ma 1995].

Auch für humane Chondrozyten konnten diese Phänomene nachgewiesen werden [Aulthouse 1989]. Als knorpelspezifisch gilt der Nachweis von Kollagen Typ II und

Einleitung und Problemstellung

Aggrecan [Yaeger 1997]. Da es im Differenzierungsverhalten von Chondrozyten unterschiedlicher Spezies erhebliche Unterschiede gibt, war dieser Nachweis eine grundsätzliche Voraussetzung für das Tissue-Engineering humaner Chondrozyten [Capasso 1982, Kuettner 1882a+b, Aydelotte 1988a+b, Riesle 1998].

1.2.4 Trägermaterialien

Die Auswahl des Trägermaterials ist für den Erfolg des Tissue-Engineering ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Nach Hutmacher [2000] sollten von einem Biomaterial für die Züchtung von Knorpelgewebe idealerweise vier Voraussetzungen erfüllt werden.

- Ein Biomaterial für die Züchtung von Knorpelgewebe sollte dreidimensional sein und eine möglichst große innere Oberfläche haben, damit die Voraussetzungen für ein Zellwachstum sowie den Transport von Nährstoffen und metabolischen Abfallstoffen bestehen.
- Es sollte biokompatibel und bioresorbierbar sein und einem kontrollierten Degradationsprozess mit definierter Resorptionsrate unterliegen, die einen ausreichenden Zeitraum für das Zell- und Gewebewachstum *in vitro* und *in vivo* bieten.
- Die chemische Zusammensetzung sollte günstig sein, so daß Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung ungestört ablaufen können. Während des Degradationsprozesses dürfen keine toxischen Substanzen freigesetzt werden.
- Die mechanischen Eigenschaften sollten aus funktionellen Gründen dem Umgebungsgewebe ähnlich sein und auch während der Degradationsphase ausreichend stabil bleiben.

In vivo sollten keine Reaktionen des umgebenden Gewebes im Sinne einer Kapselbildung, Einsprossung von Blutgefäßen oder Einwanderung von Entzündungszellen nachweisbar sein [Campoccia 1993]. In diesen Fällen wäre ein Verlust des

Einleitung und Problemstellung

Transplantates möglich. Die Abbauprodukte, die beim Degradationsprozeß anfallen, sollten dem Stoffwechsel zuführbar sein und keinesfalls die Zellfunktion negativ beeinflussen [Cortivo 1991]. Eine mechanisch sichere und stabile Fixierung des Materials im Transplantatlager muß gewährleistet sein [Dunkelmann 1995].

Es gibt eine Fülle von Biomaterialien, die für diesen Zweck untersucht wurden. Im Folgenden werden kurz einige der wichtigsten Ansätze vorgestellt:

Es konnte gezeigt werden, daß gelartige Substanzen wie Alginat [Paige 1996, Osch 2001, Susante 2000], Kollagengele [Wakitani 1989, Weiser 1999], Fibrinkleber [Haisch 1996, Fortier 1999, Meinhart 1999, Peretti 1999, Silverman 1999] oder Polypropylenoxid bzw. Polyethylenoxid [Sims 1996, Sims 1998, Arevalo-Silva 2000] zur Kultivierung von Chondrozyten grundsätzlich gut geeignet sind. Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF β und IGF können den Kulturen gut zugesetzt werden und zeigen eine Erhöhung der Exprimierung matrix-typischer Bestandteile wie Kollagen Typ II oder Glycosaminoglycane.

Gelartige Substanzen bieten jedoch nur eine geringe mechanische Stabilität, um Knorpelgewebe in einer definierten, vorgeformten Struktur zu bilden. Eine gute mechanische Stabilität ist für eine gute chirurgische Handhabung hilfreich [Hutmacher 2000].

Ein weiteres Problem ist der Prozeß der Dedifferenzierung kultivierter Chondrozyten in phänotypisch fibroblastenartige Zellen, der in Substanzen wie Fibrin auftreten kann [Homminga 1993].

Agarose ist etwas stabiler und ebenfalls geeignet, eine Redifferenzierung von Chondrozyten zu ermöglichen [Aydelotte 1988, Bujia 1993]. Der Nutzen von Agarose für humane Transplantationszwecke wird dennoch angezweifelt [Benya 1982, Aigner 2000].

Einleitung und Problemstellung

Die Verwendung demineralisierter, boviner Knochenmatrix zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse [Susante 1995, Osch 1999]. Hier werden jedoch die Vorteile im Hinblick auf die Antigenität und die Gefahr einer Übertragung von Infektionskrankheiten hinfällig.

Vielversprechende Versuche wurden auch mit der Verwendung von ungewebten Vliesstrukturen aus Polyglykolat-Polylaktid-Kopolymeren beschrieben [Freed 1993, Dunkelmann 1995, Park 1995, Mooney 1996, Puelacher 1996, Grande 1997, Freed 1998, Martin 1998, Riesle 1998, Rotter 1998]. Vliesstrukturen haben eine große innere Oberfläche, die eine gleichmäßige Zellverteilung ermöglicht. Die Bildung einer knorpelspezifischen Matrix *in vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden. Dennoch wird die Verwendung derartiger Substanzen noch diskutiert, da Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion im autologen System aufgrund der massiven Freisetzung von Säuren bestehen [Böstmann 1990, Rehm 1994, Bergsma 1995, Britt 1998, Cao 1998,].

1.2.5 Hyaluronsäure

Einige interessante Materialien werden aus Hyaluronsäure hergestellt. Als natürlicher Bestandteil der Knorpelmatrix bietet es sich an, diese für das Tissue-Engineering zu nutzen [Robinson 1990, Cortivo 1991, Butnariu-Ephrat 1996, Pavasant 1996, Campoccia 1998, Solchaga 1999].

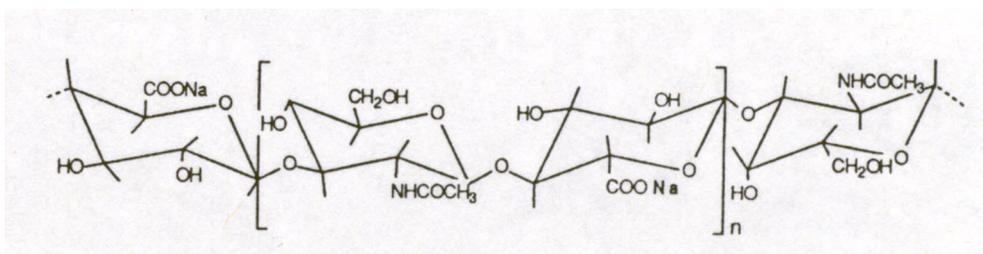


Abb. 1: Schematische Darstellung der chemischen Struktur eines Hyaluronsäuremoleküls.

Einleitung und Problemstellung

Hyaluronsäure ist ein hochmolekulares Mukopolysaccharid (Abb. 1), das sich aus ca. 12500 identischen Disacchariden (D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin-Grundeinheiten) zusammensetzt [Weiss 1995, Laurent 1996]. Ausgestreckt kann es bis zu 2,5 µm lang sein [Leonhardt 1990]. Es kommt in allen Geweben vor, in besonders hohen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit, dem Glaskörper des Auges und den Bindegeweben [Band 1996]. Hier ist es in erster Linie für die Druckelastizität verantwortlich. In Lösung ist Hyaluronsäure stark hydratisiert mit geknäulter Struktur. Im Knorpel macht Hyaluronsäure den größten Teil der Glycosaminoglycane aus und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Matrix [Leonhardt 1990].

Wünschenswert sind ihre viskös-elastischen Eigenschaften, die auch im Organismus das native Gewebe besonders von Knorpel, Synovia, Kapseln und Ligamenten vor mechanischen Schäden schützen [Campoccia 1993]. Hier bilden die Hyaluronsäuremoleküle ein kontinuierliches Netzwerk durch das gesamte Gewebe, das den Druck abfängt und die mikroanatomischen Strukturen wie z.B. Kollagenfibrillen vor einer Dislokation, Kompression oder sonstigen mechanischen Schäden schützt [Balazs 1985, Weiss 1995]. Zudem wirkt Hyaluronsäure als mechanische Barriere und molekulares Sieb, das die Diffusion großer Moleküle wie z.B. Fibrinogen verhindert [Laurent 1964]. Umgekehrt werden die Matrixbestandteile durch Aggregation zusammengehalten und vor proteolytischem Abbau geschützt [Larsen 1992]. Im Stoffwechselhaushalt von Knorpelgewebe ist Hyaluronsäure ein wichtiger Faktor, da aufgrund der Wasserspeicherfunktion die Diffusion der Nährstoffe sichergestellt wird [Weiss 1995].

Hyaluronsäure inhibiert die Migration und Anheftung von lymphomyeloider Zellen sowie die Freisetzung von Prostaglandinen [Darzynkiewicz 1971, Forrester 1980]. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration. Zudem ist Hyaluronsäure in allen Spezies gleich aufgebaut, so daß sie nicht als fremd bzw. immunogen erkannt wird [Band 1996]. Eine immunologische Abstoßungsreaktion ist somit praktisch ausgeschlossen.

Einleitung und Problemstellung

Auch in der Pathophysiologie von rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis scheinen Änderungen in der Hyaluronsäurekonzentration einen bedeutende Rolle zu spielen. Beide Erkrankungen gehen mit einem Abfall der Konzentration einher [Weiss 1995]. Bei diesen Patienten kann die bloße Applikation von Hyaluronsäure in den Gelenkspalt bereits eine Linderung der Schmerzen ermöglichen [Scale 1994, Lussier 1996].

Für den Proteoglykanstoffwechsel spielt Hyaluronsäure eine wichtige Rolle [Kawasaki 1999], da die Syntheserate von Proteoglykanen durch die Chondrozyten über die extrazelluläre Konzentration von Makromolekülen kontrolliert wird [Campocchia 1993]. Auch auf Proliferation, Migration und Differenzierung unterschiedlicher Zellen hat Hyaluronsäure Einfluß. In vitro Experimente haben gezeigt, daß die Differenzierung von Chondrozyten gefördert werden kann [Kuiawa 1986, Toole 1989, Cortivo 1990, Takahashi 1999]. Die Beeinflussung der Chondrogenese scheint dabei abhängig von der Molekülgröße der verwendeten Hyaluronsäure zu sein [Kuiawa 1986], wobei eine Steigerung der Molekülgröße positiven Einfluß zeigte. Die Angiogenese wird umgekehrt in Abhängigkeit von der Molekülgröße unterdrückt [West 1989].

Hyaluronsäure wird in großen Mengen jeden Tag im Körper umgesetzt [Band 1996]. Die Halbwertszeit ist gering und liegt in etwa bei 1-2 Tagen [Scale 1994]. Für eine Anwendung in der Gewebezüchtung oder anderen therapeutischen Bereichen ist dieser Zeitraum zu gering. Es ist daher notwendig, modifizierte Derivate der Hyaluronsäure zu entwickeln, die die erstrebenswerten Eigenschaften der physiologische Hyaluronsäure aufweisen, jedoch langsamer abgebaut wird. Üblicherweise wird dies über Anfügung hydrophober Seitenketten erreicht.

Mittlerweile gibt es verschiedene kommerzielle Hyaluronsäurepräparate für die unterschiedlichsten medizinischen Bereiche: in der Therapie der chronischen Arthritis [Scale 1994], der Augenchirurgie [Balazs 1979] und dem Schutz der Augenoberflä-

Einleitung und Problemstellung

che. Im pharmakologischen Bereich gibt es Ansätze, die Wirkstoffe an Hyaluronsäure zu binden und damit bessere Gewebespiegel zu erreichen [Weiss 1995].

Auch im Tissue-Engineering werden Hyaluronsäurederivate für unterschiedliche Aufgaben untersucht. Bereits klinisch zugelassen und kommerziell erhältlich sind unterschiedliche Präparate verschiedener Hersteller für die Züchtung von Keratinozyten zum Hautersatz, zum Beispiel Laserskin[®] oder Vivoderm[®] [Andreassi 1991, Donati 1995]. Im Versuchsstadium befindet sich der Urethralersatz auf Hyaluronsäurebasis [Italiano 1997].

Für das Tissue-Engineering von Knorpel wäre es wünschenswert, die günstigen Eigenschaften der Hyaluronsäure zu nutzen. Die gute Gewebeverträglichkeit, der positive Einfluß auf den Zellstoffwechsel, die Organisation der Matrixbestandteile innerhalb des Zellverbandes, die günstigen mechanischen Eigenschaften sowie die Tatsache, daß Hyaluronsäure bereits einen natürlichen Bestandteil des nativen Knorpels darstellt, machen sie zu einem erstrebenswerten Biomaterial.

1.3 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Adhäsion, der Vitalität und des Redifferenzierungspotential kultivierter adulter Chondrozyten in vitro und in vivo in einem neuen Biomaterial auf der Basis von Hyaluronsäure. Es ist wäßrigen Lösungen gegenüber stabiler als native Hyaluronsäure. Das Biomaterial mit dem Namen Hyaff[®]11 ist bereits als mikroperforierte Membran für die Züchtung autologer Hauttransplantate unter dem Namen Vivoderm[®] zur klinischen Behandlung von Verbrennungen und chronischen Wunden zugelassen [Andreassi 1991, Donati 1995]. Es kann in jeder gewünschten Form hergestellt werden, z.B. als Schwamm, Vlies oder Mikrosphären.

Einleitung und Problemstellung

In dieser Arbeit wurde Hyaff®11 in der Form einer ungewebten Vliesstruktur untersucht. Die ausgezeichneten qualitativen Eigenschaften hinsichtlich der Zytokompatibilität, die bereits in einer Vielzahl von Studien erwiesen wurde [Cortivo 1990, Cortivo 1991, Benedetti 1993, Campoccia 1993], legen es nahe, den Nutzen von Hyaff®11 für das Tissue-Engineering von humanem Knorpelgewebe zu überprüfen.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden humane Chondrozyten aus Knorpelbiopsien enzymatisch isoliert und vermehrt, um entsprechend den realen klinischen Anforderungen eine ausreichende Zellzahl zu erlangen. Die Zellen wurden auf die Vliese aus Hyaff®11 aufgebracht und in vitro und in vivo kultiviert. Die Adhäsion, dreidimensionale Verteilung, Morphologie und Vitalität der Zellen sowie die Art der exprimierten Matrixbestandteile wurden untersucht. Ein Vergleich unterschiedlicher Materialien wurde nicht durchgeführt, da zunächst die Eignung von Hyaff®11 als solches für das Tissue Engineering untersucht werden sollte.

Auf eine Zugabe von Adhäsions-, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wurde verzichtet, um ausschließlich die Interaktion humaner Chondrozyten mit Hyaff®11 zu beobachten.

2 Material und Methoden

2.1 Biomaterial

Es handelt sich bei dem getesteten Material um synthetische, vollständig resorbierbare Verbindungen auf der Grundlage von Hyaluronsäure, mit dem Namen Hyaff[®] 11. Es wurde von Fidia Advanced Biopolymers Srl (FAB Srl, Abano Terme, Italien) entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

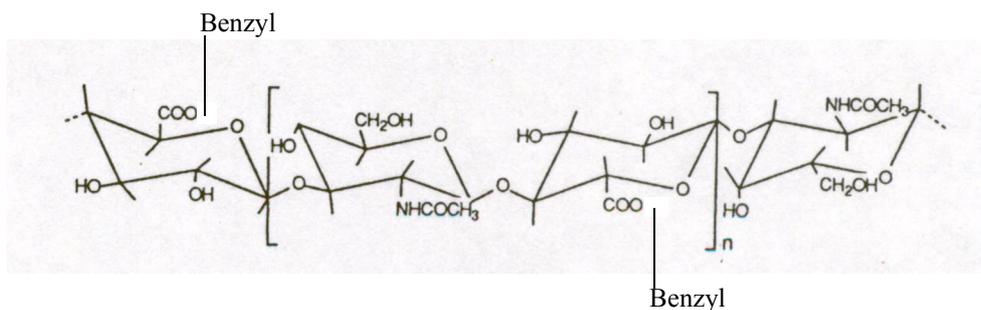


Abb. 2: Schematische Darstellung der chemischen Struktur eines Hyaff[®] 11-Moleküls.

Das Hyaff[®] 11 Polymer wird durch Veresterung von Natrium-Hyaluronat (80 - 200 kDa) mit Benzylestern an den freien Carboxylgruppen der Glucuronsäure entlang der Polymerkette gebildet (Abb. 2). Hierbei wird der Prozentsatz der veresterten Seitenketten in Abhängigkeit von der Temperatur gesteuert.

Hyaff[®] 11 wird als zu 100% veresterte Hyaluronsäure angeboten, der tatsächliche Prozentsatz des Esteranteils schwankt jedoch zwischen 87 und 100%. Die Veresterung führt zu einem Anstieg der hydrophoben Anteile und damit zu einer höheren Stabilität gegenüber wässrigen Lösungen im Vergleich mit unbehandelter Hyaluron-

Material und Methoden

säure. Auch ist das entstandene Molekül größer als das ursprüngliche. In wäßriger Lösung entstehen langsam spontane Hydrolysen der Ester-Verbindungen.

Hyaff[®] 11 wird mit Hilfe einer 2,5 mRad Standarddosis von γ -Strahlen sterilisiert. Dies beeinflusst weder die Polymerstruktur noch die Degradationsrate.

Hyaff[®] 11 kann in jeder beliebigen Form hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde es als Vliesstruktur verwendet (Abb. 3 und Abb. 4).

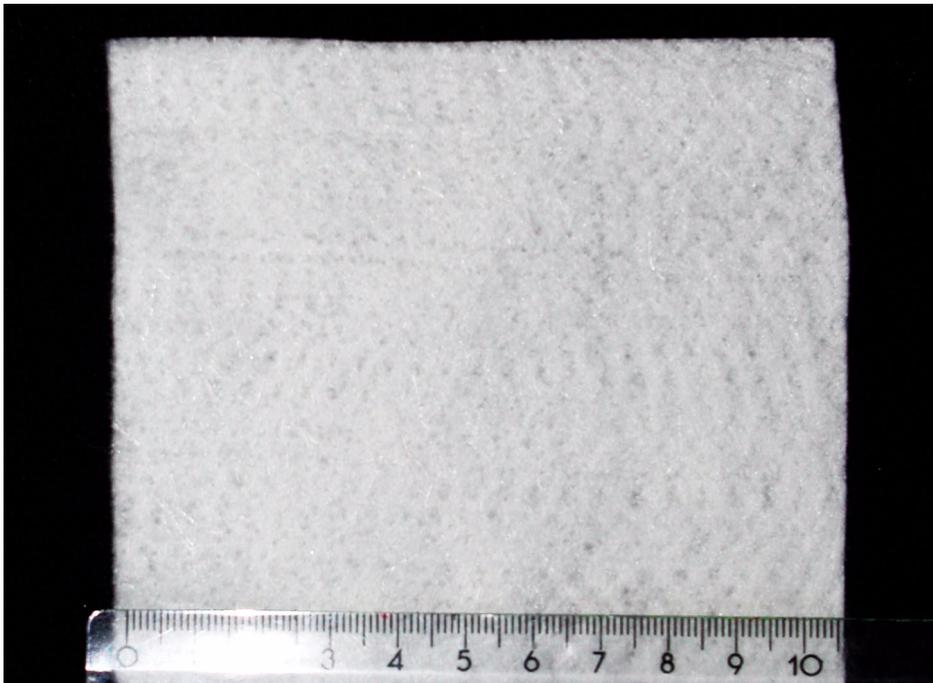


Abb. 3: Makroskopische Darstellung eines Hyaff[®] 11-Vlieses.



Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Fasern eines unbehandelten Hyaff[®] 11-Vlieses. Zu sehen sind die Fasern, die ungeordnet locker mit einander verschlungen sind. Originalvergrößerung: x 320.

Vliese bestehen aus lockeren Verschlingungen von Fasern, die ungewebt sind. Die Fasern werden durch Extrusion gebildet und haben einen Durchmesser von 20 µm unter trockenen Bedingungen.

Hyaff[®] 11 wird als quadratisches Vlies in einer Größe von 10 cm x 10 cm x 0,2 cm geliefert. Für die Experimente wurde es in Stücke der Größe 1 cm x 1 cm x 0,2 cm unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow geschnitten.

Die Trägermaterialien werden steril verpackt geliefert und können bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2 Gewinnung des Knorpelgewebes

Die Chondrozyten wurden ausschließlich aus vitalem humanen Septumknorpel isoliert. Das hyaline Knorpelpräparat wurde unter sterilen Bedingungen im Rahmen von operativen Eingriffen an der Nase gewonnen. Es handelt sich dabei um Material, das im Laufe der Operation nicht mehr benötigt wurde.

Die Knorpelpräparate wurden bis zur Zellisolierung in Vollmedium (DMEM, dem 20 mg/l Gentamicin, 10 ml/l Glutamin und 10% FCS zugefügt wurden) im CO₂-Inkubationsschrank bei 5% CO₂ und +37°C bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Jede weitere Handhabung des Knorpelgewebes oder der Chondrozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow.

2.3 Chondrozytenisolierung

Humane nasoseptale Chondrozyten wurden durch enzymatische Auflösung der extrazellulären Matrix von Septumknorpel wie von Bujia [1995c] beschrieben isoliert. Die Probe wurde hierfür zunächst mit Hilfe von Skalpell und Pinzette von Binde- und Knochengewebe sowie Perichondrium befreit. Durch Spülen mit PBS wurden eventuell anhaftende Blutreste entfernt.

Dann wurde der Knorpel in Kuben mit der Kantenlänge von 1-2 mm geschnitten, und anschließend mit 2 mg/ml Kollagenase Typ II, 0,1 mg/ml Hyaluronidase und 0,15 mg/ml DNase versetzt, die in DMEM gelöst wurden. Inkubiert wurde in Spinnerflaschen für 12-16 h bei 5% CO₂ und +37°C im CO₂-Inkubator auf einem Magnetrührer.

Material und Methoden

Pipettieren der so entstandenen Suspension durch ein Nylonsieb mit der Porengröße 50 μm [Bujia 1992]. Hinzufügen von 10% FCS zum Beenden der enzymatischen Aktivität. Zentrifugieren (10 min bei 1000 rpm) und Dekantieren des Überstandes.

Die Zellzahl und Vitalität der Zellen wurden mit Hilfe der Trypanblau-Methode bestimmt. Das Trypanblau wird von vitalen Zellen nicht aufgenommen, bei avitalen oder geschädigten Zellen hingegen werden der Zellkern und das Zytoplasma blau angefärbt.

Versetzen von 10 ml der Zellsuspension mit 0,05%iger wäßriger Trypanblau-Lösung zu gleichen Teilen. Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie des Anteils an vitalen und geschädigten Zellen in einer Neubauer Zählkammer.

2.4 Zellkulturtechniken

2.4.1 Amplifizierung in der Monolayerkultur

Die Zellen wurden zunächst zur Vermehrung in Gewebekulturflaschen mit einer Bodenfläche von 50 cm^2 , 75 cm^2 oder 125 cm^2 mit einer Dichte von 20000 Zellen/ cm^2 eingebracht und DMEM mit 10% FCS hinzugefügt. Die Größe der Kulturflasche wurde nach der Anzahl der verfügbaren Zellen ausgewählt. Die Kultivierung erfolgte unter konventionellen Bedingungen im CO_2 -Inkubationsschrank bei 5% CO_2 und $+37^\circ\text{C}$. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens dreimaliges Spülen mit PBS zur Entfernung von Calcium, Magnesium und Resten von FCS. Anschließende Inkubation der Zellen mit einer 0,05%igen Trypsin-EDTA-Lösung für 3-5 min zur Lösung vom Untergrund. Beenden des Prozesses durch Zugabe von DMEM mit 10% FCS. Zentrifugieren der Zellsuspension bei 1000 rpm. Erneute Bestimmung von Zellzahl und Vitalität mit Trypanblau, dann folgt die Aussaat auf einer größeren Fläche.

Material und Methoden

Dieser Vorgang wird als Passage bezeichnet.

Die Zellen wurden für etwa 3 Wochen kultiviert, es wurden 3-4 Passagen durchgeführt. In diesem Zeitraum wurden etwa 15×10^6 Zellen pro Patient gewonnen.

2.4.2 Dreidimensionale Zellkultur in vitro

Die Chondrozyten wurden nach der letzten Passage erneut zentrifugiert und eine Zellsuspension definierter Zelldichte hergestellt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml auf die vorher zugeschnittenen 1 cm x 1 cm x 0,2 cm großen Proben von Hyaff[®]11 in 6-well-Platten ausgesät. Die Suspension verblieb ohne weitere Zugaben für 6 h auf den Hyaff[®]11-Proben, um den Chondrozyten die Adhärenz an die Fasern zu ermöglichen. Zudem wurden die Proben stündlich gewendet, um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Dann wurden die 6-well-Platten mit je 5 ml DMEM mit 10 % FCS unter Zugabe von 50 mg/l Ascorbinsäure aufgefüllt.

Es wurden in Abhängigkeit von der Zellzahl 4-8 Proben pro Patient hergestellt, die in den 6-well-Platten weiter kultiviert wurden (Abb. 5). Die Proben wurden nach 2 Tagen in neue 6-well-Platten umgesetzt und die am Boden verbliebenen Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Damit konnte der Anteil der im Vlies adhärenen Zellen bestimmt werden. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

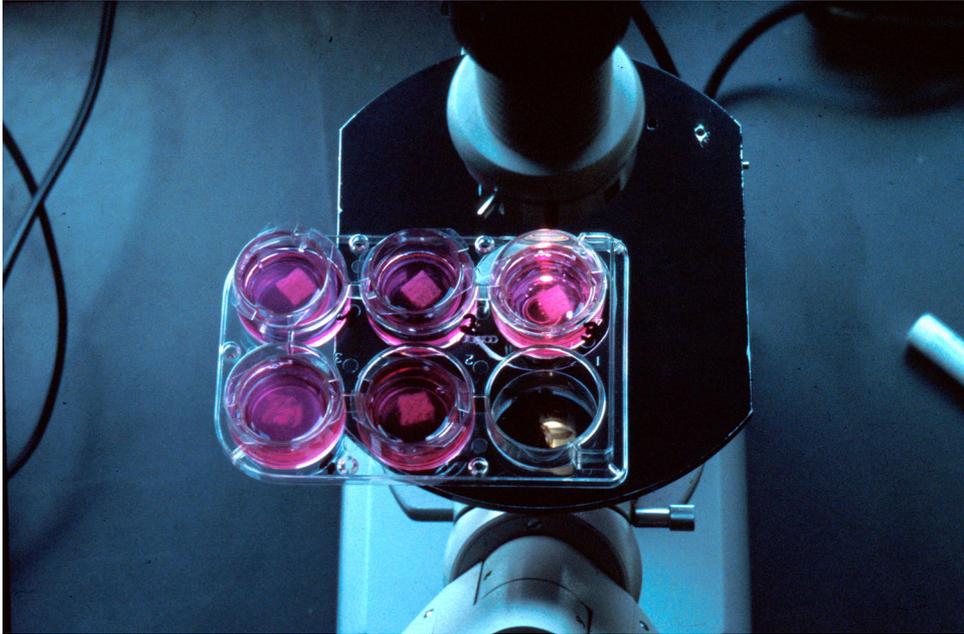


Abb. 5: Abbildung von Hyaff[®]11-Chondrozyten-Transplantaten in 6-well-Platten nach 7 Tagen *in vitro*. Die Vliese schwimmen frei in der rötlichen Medium-Lösung. Es wurde ein Transplantat je Fach kultiviert. Innerhalb einer Platte wurden nur die Zellen eines Patienten bzw. eines Pools gezüchtet.

2.5 Tiermodell

Für die *in vivo* Experimente wurden 8 Proben 26 Tage *in vitro* wie oben beschrieben kultiviert. Dann wurden die Proben subcutan in der dorsalen Region lateral der Spina von thymus-aplastischen Nacktmäusen implantiert.

Dies wurde für 4 der Proben in den Fidia Research Laboratories (Abano Terme, Italien) entsprechend den Europäischen Richtlinien für Haltung und Gebrauch von Labortieren (EC 86/609) durchgeführt. 2 männliche Nacktmäuse (HSD, athymic nu/nu, Harlan, Italien) im Alter von 6 Wochen wurden mit 12,5 ml 4%iger Chloralhydrat-Lösung anästhesiert. Pro Nacktmaus wurden 2 Proben implantiert. 4 Wochen nach der Operation wurden die Tiere durch CO₂-Asphyxierung getötet. Die

Material und Methoden

Proben wurden entnommen, zur einen Hälfte in Paraffin eingelegt und zur anderen in Compound Tissue Tek zur Anfertigung von Kryostatschnitten eingefroren.

Weitere 4 Proben wurden im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität in München in die Nacktmäuse implantiert.

Hier wurden männliche, homozygote Nacktmäuse (CD1, nu/nu, Charles River Wiga, Sutzfeld, D) im Alter von 6 Wochen verwendet.

Die Mäuse wurden zusammen in durchsichtigen Polycarbonkäfigen der Größe 10 cm x 15 cm x 15 cm auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Die Raumtemperatur betrug 26°C, die relative Luftfeuchtigkeit 60 %. Die Lichtzufuhr erfolgte zwischen 7:00 und 19:00 Uhr. Die Tiere erhielten kontinuierlich pelletierte, autoklavierte Alleindiät und steriles Leitungswasser über Tränkeflaschen. Es wurden keinerlei Antibiotika zugesetzt. Die Nacktmäuse wurden stets von allen anderen Tieren getrennt hinter einem Laminar Air Flow gehalten.

Die Narkose wurde mit Äther eingeleitet und mit Pentobarbital in einer Dosierung von 3 mg/100 g Körpergewicht weitergeführt. Nach Desinfektion der Haut wurde unter sterilen Bedingungen eine 1 cm lange Inzision in der Haut im dorsalen Bereich lateral der Spina gesetzt, eine subcutane Tasche angelegt und die Probe eingesetzt. Analoges Vorgehen auf der kontralateralen Seite. Der Wundverschluß erfolgte mit Einzelknopfnähten mit Seralon. Postoperativ war keine Schmerzbekämpfung erforderlich. Die Entfernung der Fäden erfolgte am 7. postoperativen Tag.

12 Wochen nach der Operation wurden die Tiere nach einer Narkoseeinleitung mit Äther durch eine Überdosis Pentobarbital getötet und die Proben entnommen. Nach Entfernung des Bindegewebes wurden die Proben fotografisch dokumentiert und in O.C.T. Compound Tissue Tek eingebettet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C eingefroren.

2.6 Untersuchungen zum Transplantataufbau

2.6.1 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung

Für morphologische Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden die Proben nach 10, 18, 27, 33 und 42 Tagen in vitro zunächst in DMEM kurz gewaschen, dann in 3% Glutaraldehyd mit einem pH von 7,4 für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min in PBS fünfmal bei Raumtemperatur gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol p.a.) dehydriert. Anschließend wurden die Proben in der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität mit CO₂ im Critical Point Dryer getrocknet und mit Gold überzogen. Die Untersuchung erfolgte in einem Rasterelektronenmikroskop vom Typ JEOL-ISM-35CF.

2.6.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) diente zur optimalen Rekonstruktion der Zellverteilung, Morphologie und Vitalität der Chondrozyten im dreidimensionalen Verband. Es stellt ein besonders gutes Verfahren zur Beurteilung des Aufbaus von Gewebe dar [Guilak 1995, Aigner 1997].

Die Proben wurden in der gsf Neuherberg (München) mit Hilfe eines confocal-laser-scanning-microscope LSM 410 von Zeiss untersucht. Die Fluoreszenzen wurden simultan mit einem Argon-Laser angeregt und detektiert: Die Anregung der grünen Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 515 - 565 nm und die der roten Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm.

Es wurden nacheinander Bilder in verschiedenen Schichtebenen gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Abstand mit 4 mm festgelegt. Die sinnvolle Eindringtiefe für eine dreidimensionale Rekonstruktion hängt von der Dichte des

Material und Methoden

untersuchten Materials ab. Sie betrug 180-240 mm bei den Proben aus der in vitro-Zellkultur, hingegen nur 30 mm bei den Proben aus dem Tiermodell.

Anschließend wurden die Einzelbilder computergestützt mit Hilfe der Zeiss LSM Software zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt. Die Farbe auf den Bildern entspricht dabei nicht der realen, sondern wurde mit Hilfe der Computerverarbeitung willkürlich festgelegt.

2.6.2.1 Untersuchung der Vitalität in der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Die Färbung erfolgte mit dem Eukolight Viability/Cytotoxicity-Test-Kit nach dem Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden im Zellverband für 2 min in Hank'scher Lösung gewaschen und für 30 min in der Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung besteht aus 4 ml einer 2 mM Ethidium-Homodimer D-1-Lösung und 1 ml einer 4 mM Calcein-AM-Lösung, die in 2 ml Hank'scher Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gelöst wurden. Anschließend wurde die Probe 5 min in Hank'scher Lösung unter Lichtausschluß gespült.

In den vitalen, ungeschädigten Zellen wird das Calcein-AM mit Hilfe eines zytoplasmatischen Enzyms zu einem intensiven, grün fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt. Das Ethidium-Homodimer dagegen passiert die beschädigte Membran des Nucleus der avitalen Zellen und ruft dort eine leuchtend rote Fluoreszenz hervor.

Diese Methode eignet sich exzellent zur Darstellung der tatsächlichen Vitalitäts- und Besiedelungsverhältnisse der Zellen im dreidimensionalen Verband, da die Färbung in einem einzigen Schritt erfolgt und die Zellen unfixiert bleiben. Hierdurch werden Artefakte weitgehend ausgeschlossen.

2.6.2.2 Darstellung von Kollagen Typ I und II in der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Der Nachweis der Kollagene erfolgte nach den Methoden der Immunhistochemie wie unten (siehe 2.9.2.3) beschrieben. Der Sekundärantikörper war hierbei mit einem Fluochrom gekoppelt, wobei Kollagen I grün dargestellt wurde, Kollagen II dagegen rot. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff markiert. Durch die computergestützte Verarbeitung wurden auch hier die Farben willkürlich gewählt, so daß die jeweiligen Kollagene magentarot erscheinen. Die Zellkerne sind leuchtend blau dargestellt.

2.7 Kryokonservierung der Proben und Anfertigung von Gefrierschnitten

Die jeweilige Probe wurde in ein Tissue-Tek Cryomold gelegt und in Tissue-Tek O.C.T. Compound eingebettet. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Anfertigung der Schnitte wurden die Proben langsam auf eine Temperatur von -25°C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurden Serienschnitte von 5 mm Dicke für die histochemische und immunhistochemische Untersuchung angefertigt, sowie in einer Dicke von 30 mm für die Untersuchung der Proben aus dem Tiermodell mittels der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Schnitte wurden auf Objektträger vom Typ SuperFrost*/Plus aufgebracht und bei Raumtemperatur für 12-16 h getrocknet. Anschließend wurden sie bei -80°C aufbewahrt.

2.8 Histochemie

2.8.1 Hämatoxylin-Färbung

Die Objektträger mit den Kryostatschnitten wurden bei Raumtemperatur für 5-7 min in einer sauren Hämalaulösung nach Mayer/Romeis gefärbt. Anschließend wurde dreimal für 3 min mit Leitungswasser der Stadtwerke München gespült.

Die Färbung dient der besseren morphologischen Beurteilung und kann auch im Anschluß an immunhistochemische Färbungen erfolgen.

2.8.2 Azanfärbung

Die Azanfärbung nach Heidenhain diente dem allgemeinen Nachweis von Kollagenfasern.

Nachdem die Objektträger langsam von -80°C auf Raumtemperatur erwärmt wurden, wurden die Gewebeschnitte mit Carnoy'scher Lösung für 10 min fixiert. Diese besteht zu 6 Teilen aus Ethanol 96%, 3 Teilen Chloroform und 1 Teil Essigsäure 99%. Es folgte eine Spülung mit Aqua destillata für 3 min. Anschließend wurde mit Anilinalkohol, d.h. 0,1% Hydroxyanilin in Ethanol 96%, für 5 min inkubiert und danach wieder mit Aqua destillata gespült. Dann folgte die Färbung der Zellkerne mit Azokarmin G Färbelösung für 60 min bei $56-60^{\circ}\text{C}$ auf der Heizplatte. Die Färbelösung bestand aus 0,1 g Azokarmin G, das in 100 ml Aqua destillata gelöst und kurz aufgekocht wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Faltpfiltern filtriert und mit 1 ml Eisessig versetzt.

Anschließend wurden die Objektträger für 10-15 min bei Raumtemperatur abgekühlt, mit Aqua destillata gespült und zur Differenzierung der Kerne vom Hintergrund unter mikroskopischer Kontrolle für 5-10 min in Anilinalkohol 1% inkubiert.

Material und Methoden

Das Anilin wurde mit essigsauerm Alkohol, d.h. 1% Eisessig in Ethanol 96%, für 1 min ausgewaschen und dann mit Aqua destillata gespült. Dann wurde für 45 min in einer wäßrigen Phosphorwolframsäure (50 g/l) inkubiert, erneut mit Aqua destillata gewaschen, und für 40 min mit einem Aniliblau-Goldorange-Essiggemisch gefärbt. Dieses bestand aus 0,5 g Methylenblau und 2 g Goldorange G, das in 100 ml Aqua destillata gelöst und nach Zugabe von 8 ml Eisessig aufgeköcht und nach dem Erkalten filtriert und im Verhältnis 1:4 mit Aqua destillata verdünnt wurde.

Im Anschluß an diese Arbeitsschritte wurde noch einmal kurz mit Aqua destillata gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 2.6.1), mit Xylol entwässert und mit Eukitt auf dem Objektträger eingebettet.

2.8.3 Kernechtrot-Kombinationsfärbung

Alternativ zur Azanfärbung nach Heidenhain stand diese Simultan-Kombinationsfärbung nach Sterba-Schobess für die allgemeine Darstellung von Kollagenen zur Verfügung.

Für den Ansatz wurden 1,5 g Anilinblau, 2,0 g Baumwollblau, 1,0 g Wasserblau, 2,0 g Orange G, 10,0 g Kernechtrot, 4,0 g Weinsäure, 8,0 g Phosphorwolframsäure und 40,0 g Kalialaun in einem Mörser gut vermischt. Dann wurde 1,0 g dieser Mischung mit 100 ml Aqua destillata kurz aufgeköcht, schnell im Eisschrank abgekühlt, mit 2 ml Propylalkohol versetzt und die Lösung filtriert.

Die Schnitte wurden für 90 s in einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch fixiert. Dann wurde für 20 min in der Färbelösung inkubiert. Die Schnitte dürfen danach nur kurz in Aqua destillata abgespült werden und müssen anschließend sofort in Propylalkohol 94% für 10-15 s unter ständiger Sichtkontrolle gewaschen werden. Die Schnitte wurden wie oben beschrieben mit absolutem Ethanol und Xylol entwässert und in Eukitt eingebettet.

Material und Methoden

2.8.4 Safranin O-Färbung

Mit Hilfe dieser Methode können Polyanionen wie Glykosamoglykane und Proteoglykane dargestellt werden.

Die Schnitte wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht und für 90 s in einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch fixiert und für 5 min in PBS gewaschen. Dann wurden sie für 30 min in der Färbelösung inkubiert. Für diese wurden 0,05 g Safranin in 50 ml Glutaraldehydlösung 2% in PBS gelöst. Anschließend wurde erneut kurz in PBS unter Sichtkontrolle im Mikroskop gewaschen, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 2.6.1) und Xylol entwässert und in Eukitt eingebettet.

2.8.5 Alcianblaufärbung

Diese Färbung diente der Darstellung von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen.

Dazu werden zunächst die Kryostatschnitte von -80°C auf Raumtemperatur gebracht. Die Fixierung erfolgte für 10-15min in einer Formalinlösung 3,5% in Phosphate Buffered Saline. Anschließend wurde in Leitungswasser 10-15 min hydriert, und für 3-5 min mit Essigsäure 3% beschichtet.

Die Färbung erfolgte mit Alcianblaulösung für 1 h bei Raumtemperatur. Hierfür wurde 1 g Alcianblau 8 GX in 100 ml Essigsäure 3% gelöst. Danach wurden die Schnitte mit Essigsäure 1% abgespült und für 5 min in Aqua destillata gewaschen. Sodann erfolgte die Gegenfärbung mit einer 1%igen wäßrigen Kernechtrotlösung für 10 min. Hierfür wurden 0,2 g Kernechtrot in 200 ml kochender Aluminiumpotassium-Sulfat-Lösung 5% gelöst, für weitere 5-10 min gekocht und nach dem Abkühlen filtriert. Dann wurde kurz mit Aqua destillata gespült und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 2.6.1) und Xylol entwässert. Die Einbettung erfolgte mit Eukitt.

2.9 Immunhistochemie

Für die einzelnen Antikörper wurden Verdünnungsreihen durchgeführt, um die optimalen Verdünnungen und Inkubationszeiten zu ermitteln.

2.9.1 Primär-Antikörper

2.9.1.1 Kollagen Typ II

Für den Nachweis von humanen Kollagen Typ II standen mehrere Antikörper zur Verfügung.

Monoklonaler Antikörper Yoo, der aus der Maus stammt und freundlicherweise von Prof. Yoo (Department of Medicine, University of Tennessee, Memphis, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Verdünnung betrug 1:50 in Schweineserum 5% in TBS, die Inkubationszeit 16-18 h bei 37°C.

Monoklonaler Maus-anti-humanes Kollagen Typ II Antikörper (Invest.: Th. Linsenmayer). Dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1:2 in Glycerin 1% gelöst. Die Endkonzentration betrug 1:100 in Schweineserum 5% in TBS. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur.

Polyklonaler Antikörper quartett Cat. No. 031500205 aus dem Kaninchen. Er wurde im Verhältnis 1:20 in Ziegenserum 5% in TBS gelöst, und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Monoklonaler Antikörper PS-48 aus dem Kaninchen der Firma Monosan. Die Verdünnung betrug 1:20 in Schweineserum 5% in TBS, die Inkubationszeit 2 - 2,5 h bei 37°C.

Material und Methoden

2.9.1.2 Kollagen Typ I

Verwendet wurde der monoklonale Antikörper PS-47 der Firma Monosan. Er wurde im Kaninchen hergestellt. Die Verdünnung betrug 1:30 in Schweineserum 5% in TBS gelöst, die Inkubationszeit lag bei 2 - 2,5 h bei 37°C im Brutschrank.

Des weiteren stand der polyklonale Kollagen Typ I Antikörper der Firma Chemicon zur Verfügung, der ebenfalls im Kaninchen hergestellt wurde. Die Verdünnung betrug 1:100 in Schweineserum 5% in TBS, die Inkubationszeit bei Raumtemperatur 2 - 3 h.

2.9.1.3 Chondroitinsulfat

Verwendet wurde der Antikörper AB 1918 gegen humanes Chondroitin-4-Sulfat. Dieser polyklonale Antikörper wurde im Kaninchen hergestellt. Die Verdünnung betrug 1:300, die Inkubationszeit 30 min bei Raumtemperatur. Vor Applikation erfolgte die Vorbehandlung des Präparates mit Chondroitinase ABC für 10 min.

2.9.1.4 Keratansulfat

Hier wurde der Antikörper AN 9P1 verwendet. Dieser monoklonale Antikörper wurde in der Maus hergestellt, die Verdünnung betrug 1:10 in 5%igem Schweineserum, die Inkubationszeit 30 min bei Raumtemperatur. Freundlicherweise wurde uns dieser Antikörper von Prof. Poole (Shriners Hospital, Montreal, Kanada) zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

2.9.2 Detektionssysteme

2.9.2.1 Indirekte Peroxidase-Methode

Die Kryostatschnitte wurden zunächst langsam auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurden die Schnitte der Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Proben in einem 1:1 Methanol/Aceton Gemisch für 90 sec fixiert. Die Kontrollschnitte von Knorpel oder Haut wurden 10 min mit Aceton fixiert.

Anschließend wurde für je 5 min zweimal mit TBS gespült. Dann wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit einer 0,2 %igen H₂O₂-Lösung in TBS inkubiert, um eine möglicherweise vorhandene endogene Peroxidase zu blockieren. Wiederum wurde zweimal 5 min in TBS gewaschen. Die Knorpelschnitte wurden dann bei Raumtemperatur für 3-5 min mit Hyaluronidase behandelt und wieder in TBS gewaschen.

Zur Blockade der unspezifischen Bindungen wurde mit Schweineserum (1:5 in TBS gelöst) für 20 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Das überschüssige Serum wurde abgeklopft und der gewünschte Primärantikörper aufgebracht. Anschließend wurde zweimal 5 min in TBS gewaschen. Dann wurde mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörper, ein Anti-Maus-, bzw. Anti-Kaninchen-Immunglobulin, das bereits mit dem POX-Enzymkomplex gekoppelt war, bei einer Verdünnung von 1:50 in 5% Schweineserum für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Visualisierung erfolgte mit der AEC-Methode (3-Amino-9-Ethylcarbazol). Hierfür wurden 20 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst. 95 ml eines 0,1 M Natriumacetatpuffers mit einem pH von 5,5 wurden dazugegeben und mit 20 ml H₂O₂ verrührt. Die Schnitte wurden für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Material und Methoden

Es folgte ein zweimaliges Waschen in TBS für je 5 min und die Gegenfärbung mit Hämalaun (siehe 2.8.1). Eingebettet wurde mit Kaiser's Glyceringelatine.

2.9.2.2 Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase

Die Vorbereitung der Schnitte einschließlich des Primärantikörpers erfolgte wie unten beschrieben (siehe 2.9.2). Der jeweilige Sekundär-Antikörper Kaninchen-anti-Maus oder Ziege-anti-Kaninchen wurde in einer Verdünnung 1:50 in Schweineserum 5% aufgetragen und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS wurde mit dem APAAP-Immunkomplex in einer Verdünnung von 1:100 in Schweineserum 5% für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend in TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper sowie dem APAAP-Immunkomplex wurde dann für je 10 min wiederholt.

Angefärbt wurde mit Hilfe der Neufuchsin-Methode nach Cordell. Hierfür wurden 218 ml 0,2 M 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propanediol mit 50 ml Tris-Puffer (pH 9,7), 600 mg NaCl und 28 mg Levamisol nacheinander gemischt. Dann wurden 30 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat in 600 ml Dimethylformamid gelöst zugegeben.

Es wurden 20 mg Natriumnitrit in 500 ml Aqua destillata gelöst und mit 200 ml einer 5%igen Neufuchsinlösung versetzt. Für diese wurden 5 g Neufuchsin in 100 ml 2 M HCl gelöst.

Beide Lösungen wurden vermischt und auf einen pH 8,7 eingestellt. Die Schnitte wurden mit der filtrierten Färbelösung für 20 min bei Raumtemperatur in einer Färbeküvette inkubiert. Schließlich wurde kurz mit TBS gewaschen, mit Hämalaun gegengefärbt (siehe 2.8.1) und in Kaiser's Glyceringelatine eingebettet.

Material und Methoden

2.9.2.3 Fluochrome

Die Vorbereitung der Schnitte bis einschließlich der Applizierung des Primärantikörpers erfolgte wie oben beschrieben.

Für den Nachweis von Kollagen II mittels Fluoreszenz sind die Primärantikörper Yoo oder Linsenmayer besonders geeignet. Als Sekundärantikörper fungiert Ziege-anti-Maus-Texas Red, das in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min aufgetragen wird. Bei Grünanregung (Wellenlänge 645 nm) im Lichtmikroskop erscheinen positive Bereiche leuchtend rot.

Der Nachweis von Kollagen I erfolgte mittels des polyklonalen Kollagen Typ I Antikörpers (Chemicon, Temicula, CA), der mit einem Tetra-Methyl-Rhodamin-Iso-cyanat konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper visualisiert wird. Bei Blauanregung (Wellenlänge 490 nm) werden die markierten Bereiche grün.

Keratansulfat wurde mit Hilfe des AN 9P1-Antikörpers markiert (siehe 2.9.1.4). Die Detektion erfolgte mit dem Ziege-anti-Maus-Texas Red Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min aufgetragen wird. Bei Grünanregung (Wellenlänge 645 nm) im Lichtmikroskop erscheinen positive Bereiche leuchtend rot.

Bei allen immunhistochemischen Verfahren wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt in Form von Geweben, die das Antigen sicher enthalten bzw. nicht enthalten. Zur Aufdeckung unspezifischer Anfärbung des Hintergrundes wurden Kontrollschnitte der Proben mitgeführt, bei denen der jeweilige Primärantikörper durch TBS ersetzt wurde. Die restliche Färbung wurde exakt gleich durchgeführt.

2.10 Liste der verwendeten Materialien

Aceton (Merck, Darmstadt, D)

Äther zur Narkose (Hoechst, Frankfurt, D)

Alcianblau 8 GX (Sigma, München, D)

Aluminiumpotassium-Sulfat-Lösung 5% (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

3-Amino-9-Ethylcarbazol (Sigma, Deisenhofen, D)

2-Amino-2Methyl-1,3-Propandiol 0,2 M (Merck, Darmstadt, D)

Anilinblau (Merck, Darmstadt, D)

APAAP-Immunkomplex (Dako, A/S, Dk)

Aqua destillata (Braun, Melsungen, D)

Ascorbinsäure (Sigma, St.Louis, USA)

Autoklavierte Alleindiät Ssniff NM (Charles River Wiga, Sulzfeld, D)

Azokarmin G (Merck, Darmstadt, D)

Baumwollblau (Merck, Darmstadt, D)

Brutschrank (Forma Scientific CO₂ Incubator model 3028, Life Sciences Int., Frankfurt, D)

Chloralhydrat-Lösung (Carlo Erba, I)

Chloroform (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Chondroitinase ABC (Sigma, Deisenhofen, D)

confocal-laser-scanning-microscope LSM 410 (Zeiss, Oberkochen, D)

Critical Point Dryer (BAL-TEC CPD 030, Balzers, D)

Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, D)

Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt, D)

DNase (Paesel, Frankfurt, D)

Dulbecco's MEM (Seromed, Berlin, D)

Eisessig (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Elektronenmikroskop JEOL-ISM-35CF (JEOL, Tokio, J)

Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Deutschland)

Eukitt (Kindler, Freiburg, D)

Material und Methoden

Eukolight Viability/Cytotoxicity-Test-Kit (MoBiTec, Göttingen, D)
Essigsäure p.a. (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)
Ethanol p.a. (Merck, Darmstadt, D)
Ethanol 96% (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)
Faltfilter (Merck, Darmstadt, D)
Fetal Calf Serum (Gibco BRL, Deisenhofen, D)
Flüssiger Stickstoff (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)
Formalinlösung 3,5% (Merck, Darmstadt, D)
Goat-anti-Rabbit-Antikörper (Dako, Hamburg, D)
Gewebekulturflaschen 50 cm² und 75 cm² (Falcon/Becton Dickinson Europe, Meylan Cedix, F)
Gewebekulturflaschen 125 cm² (Greiner, Frickenhausen, D)
Glutamin 200 mM (Biochrom, Berlin, D)
Glutaraldehydlösung (Sigma, München, D)
Glycerin 87% (Merck, Darmstadt, D)
Goldorange G (Aldrich, Steinheim, D)
Hank'sche Lösung (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)
Heizplatte (Störk-Tronik, D)
Hyaff[®]11 (Fidia Advanced Biopolymers Srl, Abano Terme, I)
Hyaluronidase (Serva, Berlin, D)
Hydroxyanilin (Fluka, Buchs, CA)
Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, D).
Kalialaun (Merck, Darmstadt, D)
Kernechtrot (Sigma, München, D)
Kollagenase Typ II (Seromed, Berlin, D)
Kryostat (Typ 1720, Ernst Leitz, Wetzlar, D)
Laminar Air Flow (Ceag Schirp "Envirca", Bork/Westfalen, D)
Laminar Air Flow Typ G1 (W. Ehret, Emmendingen, D)
Levamisol (Sigma, München, D)
Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, D)
Magnetrührer (Störk-Tronik, D)

Material und Methoden

Methanol (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Methylenblau (Aldrich, Steinheim, D)

Monoklonaler Kaninchen-anti-humanes Kollagen Typ I Antikörper PS-47
(Monosan, Uden, NL)

Monoklonaler Maus-anti-humanes Kollagen Typ II Antikörper moAB,
freundlicherweise von Prof. Yoo (Department of Medicine, University of Tennessee,
Memphis, USA) zur Verfügung gestellt

Monoklonaler Maus-anti-humanes Kollagen Typ II Antikörper (II-II 6 B 3,
Hybridoma Name, USA) Invset: Th. Linsenmayer

Monoklonaler Kaninchen-anti-humanes Kollagen Typ II Antikörper PS-48
(Monosan, Uden, NL)

Monoklonaler Maus-anti-humanes Keratansulfat Antikörper AN 9P1, freundlicher-
weise von Prof. Poole (Shriners Hospital, Montreal, CAN) zur Verfügung gestellt
NaCl (Merck, Darmstadt, D)

Naphtol-As-Bi-Phosphat (Sigma, München, D)

Natriumacetatpuffer 0,1 M (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Natriumnitrit (Sigma, München, D)

Neufuchsin (Sigma, München, D)

Nembutal[®] (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Hannover, D)

Neubauer Zählkammer 5 µl (Madaus AG, Köln, D)

Nylonsieb, 50 mm Porengröße (Reichert Chemietechnik, Heidelberg, D)

Nylonsieb, 50 mm Porengröße (Nunc, DK)

Objektträger des Typs SuperFrost*/Plus (Menzel-Gläser, D)

Orange G (Aldrich, Steinheim, D)

Perhydrol 30% (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Peroxidase-konjugierter Antikörper (Dako, A/S, DK)

Petrischalen (Nunc, DK)

Phosphat Buffered Saline (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Pipetten zu 5 ml und 25 ml (Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Pipetten zu 2 ml, 5 ml, 10 ml (Gold Seal/Becton Dickinson Labware Europe,
Meylan Cedex, F)

Material und Methoden

Probengefäß (Minutissue, Bad Abbach, D)
Polycarbonkäfige Makrolon[®] (W. Ehret, Emmendingen, D)
Polyklonaler Kaninchen-anti-humanes Kollagen Typ I Antikörper (Chemicon, Temicula, USA)
Polyklonaler Kaninchen-anti-humanes Kollagen Typ II Antikörper quartett
Cat. No. 031500205 (quartett, Berlin, D)
Polyklonaler Kaninchen-anti-humanes Chondroitin-4-Sulfat Antikörper AB 1918
(Chemicon, Temicula, USA)
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Dako, Hamburg, D)
Polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Tetramethylrhodaminisothiocyanat konjugierter
Antikörper (Sigma, Deisenhofen, D)
Polyklonaler Ziege-anti-Maus-Texas Red konjugierter Antikörper (Dianova,
Hamburg, D)
Polypropylenröhrchen zu 10 ml und 50 ml (Becton Dickinson, Heidelberg, D)
2-Propanol (Merck, Darmstadt, D)
Propylalkohol 94% (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)
Refobacin[®] (Merck, Darmstadt, D)
rabbitt-anti-mouse-POX-Enzymkomplex (Dako, DK)
Safranin (Merck, Darmstadt, D)
Salzsäure 2 M (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)
Saure Hämlaunlösung nach Mayer/Romeis (Apotheke Klinikum Großhadern,
München, D)
Schweineserum (Dako A/S, Glostrup, DK)
SEM coating system (Polaron, Waterford, GB)
Seralon (Ethicon, Norderstedt, D)
Spinnerflaschen (Renner, Darmstadt, D)
Schwein-anti-Kaninchen-POX-Enzymkomplex (Dako, DK)
Taumler (Heidolph, D)
Tissue-Tek Cryomold (Miles INC, Elkhart, USA)
Tissue-Tek O.C.T. Compound (Miles INC, Elkhart, USA)
Tris-Puffer (Merck, Darmstadt, D)

Material und Methoden

Trypanblaulösung (Fluka AG, Neu-Ulm, D)

Trypsin-EDTA-Lösung 0,05% (Seromed, Berlin, D)

Varifuge K (Hareus Sepatech, Osterodeam, Harz, D)

Wäßrige Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt, D)

Wasserblau (Merck, Darmstadt, D)

Weichholzgranulat Ssniff (W. Ehret, Emmendingen, D)

6-well-Platten Nunclon (Nunc, DK)

Weinsäure (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)

Xylol (Merck, Darmstadt, D)

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur

3.1.1 Chondrozytenisolierung und Vermehrung

Die Chondrozyten wurden aus hyalinem, nasoseptalen Knorpel wie oben beschrieben isoliert und in den Gewebekulturflaschen vermehrt.

Die Anzahl von Zellen, die aus einer Probe isoliert werden konnte, betrug $2,8 \pm 1,2 \times 10^5$ und hing im wesentlichen von der Größe der Probe und individuellen Faktoren ab. Die Probengröße variierte zwischen ca. 0,1 und 0,3 cm³. Das Alter und das Geschlecht zeigten keinen erkennbaren Einfluß.

Der größte Teil der Versuche wurde mit Kulturen durchgeführt, deren Zellen nur von einem Individuum stammten, da dies den klinischen Voraussetzungen entspricht. Weiter werden mögliche, unerwünschte interindividuelle Reaktionen der Zellen vermieden. Es wurden 24 dieser Kulturen (EP1-24) angesetzt (Tab. 1).

Der kleinere Teil der Proben wurde bereits in der Vermehrungsphase zu einem Pool zusammengefaßt, d.h. die Chondrozyten von 3 Patienten wurden in einer Kultur zusammen gezüchtet. Das Zusammenfassen mehrerer Proben führt zu einem schnelleren Erreichen der gewünschten Zellzahl und somit eine kürzere Amplifizierungszeit sowie geringere Passagenanzahl. Es wurden 7 Pools angesetzt (Tab. 2).

Ergebnisse

Tabelle 1: Aufstellung der untersuchten Proben von Einzelpatienten (EP). Berücksichtigt werden das Alter, Geschlecht des Patienten, die Ausgangs- und Endzellzahl nach Abschluß der Vermehrung in der Monolayerkultur sowie die Passagenanzahl (Pas.).

Probe-Nr.	Alter	Geschlecht	Ausgangszellzahl	Endzellzahl	Pas.
EP1	63	m	0.18 x 10 ⁶	7.6 x 10 ⁶	4
EP2	48	m	0.27 x 10 ⁶	8.2 x 10 ⁶	4
EP3	31	m	0.39 x 10 ⁶	15.4 x 10 ⁶	3
EP4	42	m	5.49 x 10 ⁶	46.5 x 10 ⁶	3
EP5	33	m	0.47 x 10 ⁶	14.9 x 10 ⁶	4
EP6	47	m	0.23 x 10 ⁶	11.3 x 10 ⁶	4
EP7	unbekannt	unbekannt	0.91 x 10 ⁶	18.9 x 10 ⁶	3
EP8	38	m	0.39 x 10 ⁶	10.9 x 10 ⁶	4
EP9	43	m	0.41 x 10 ⁶	11.4 x 10 ⁶	4
EP10	37	m	0.32 x 10 ⁶	14.5 x 10 ⁶	3
EP11	45	m	0.19 x 10 ⁶	10.4 x 10 ⁶	4
EP12	27	w	0.17 x 10 ⁶	3.7 x 10 ⁶	3
EP13	34	m	0.17 x 10 ⁶	7.2 x 10 ⁶	3
EP14	26	m	0.7 x 10 ⁶	16.4 x 10 ⁶	4
EP15	58	m	1.91 x 10 ⁶	26.1 x 10 ⁶	4.
EP16	49	m	0.97 x 10 ⁶	15.8 x 10 ⁶	3
EP17	35	m	0.08 x 10 ⁶	9.6 x 10 ⁶	4
EP18	37	m	0.23 x 10 ⁶	14.7 x 10 ⁶	4
EP19	46	m	1.37 x 10 ⁶	24.6 x 10 ⁶	4
EP20	unbekannt	unbekannt	0.78 x 10 ⁶	24.1 x 10 ⁶	4
EP21	27	m	0.65 x 10 ⁶	17.4 x 10 ⁶	3
EP22	35	m	0.79 x 10 ⁶	18.6 x 10 ⁶	3
EP23	42	w	0.87 x 10 ⁶	23.8 x 10 ⁶	3
EP24	53	m	1.25 x 10 ⁶	18.6 x 10 ⁶	2

Ergebnisse

Tabelle 2: Aufstellung der untersuchten Patientenproben als Pool. Berücksichtigt werden das Alter und Geschlecht der Patienten (Pat.) sowie die Ausgangszellzahl und die Anzahl der gewonnenen Zellen nach Abschluß der Vermehrung in der Monolayerkultur (Endzellzahl). Die Anzahl der hierfür nötigen Passagen (Pas.) ist ebenfalls aufgeführt.

Probe-Nr.	Alter	Geschlecht	Ausgangszellzahl	Endzellzahl	Pas.
Pool I	41	m	1.23 x 10 ⁶	21 x 10 ⁶	2
3 Pat.	19	m			
	52	m			
Pool II	46	w	0.47 x 10 ⁶	13.7 x 10 ⁶	3
3 Pat.	23	w			
	unbekannt	unbekannt			
Pool III	57	m	2.31 x 10 ⁶	Ausfall durch Kon- tamination	
2 Pat.	unbekannt	m			
Pool IV	66	m	0.57 x 10 ⁶	Ausfall durch Kon- tamination	
2 Pat.	45	m			
Pool V	55	m	4.22 x 10 ⁶	18.6 x 10 ⁶	2
3 Pat.	47	m			
	57	m			
Pool VI	31	w	2.43 x 10 ⁶	12.1 x 10 ⁶	2
3 Pat.	50	w			
	43	m			
Pool VII	77	m	7.21 x 10 ⁶	23 x 10 ⁶	3
4 Pat.	22	w			
	40	m			
	38	m			

In der Kultivierungsphase konnte die Zellzahl bei den EP-Proben auf ca. 15x 10⁶ gesteigert werden. Der hierfür notwendige Zeitraum lag im Mittel bei 35 ±8 Tagen, es wurden 3-4 Passagen benötigt. In einem Pool, der aus mehreren Patienten gebildet wurde, war die hierfür benötigte Zeit geringer, sie lag bei ca. 20 ±4 Tagen. Ebenso war die Anzahl der notwendigen Passagen mit 2-3 geringer.

Die Teilungsrate der Zellen ist stark von unklaren individuellen Faktoren abhängig und kann nicht vorausgesagt werden.

3.1.2 Untersuchungen zur Stabilität des Chondrozytenphänotyps

Der Chondrozytenphänotyp wird üblicherweise anhand der von den Zellen exprimierten Matrixbestandteile sowie der Zellmorphologie charakterisiert. Es ist bislang kein zuverlässig spezifischer, kommerziell erwerbbarer Chondrozytenmarker verfügbar.

Die charakteristische Matrix enthält Kollagen Typ II als wichtigsten Marker, sowie Proteoglykane, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Im allgemeinen wird in der Literatur die Expression auf Kollagen Typ II als Marker für differenzierte Chondrozyten angesehen [Mark 1977, Benya 1982].

3.1.2.1 Änderungen der Zellmorphologie

Im dreidimensionalen Gefüge des Knorpels liegen die Chondrozyten rund-oval und ohne gegenseitigen Zellkontakt in ihren Lakunen in der Grundsubstanz [Leonhardt 1990]. Nach der Isolierung nehmen die Chondrozyten bei Adhäsion an dem Flaschenboden eine spindelförmige Gestalt mit Zellausläufern an, die an Fibrozyten erinnern (Abb. 6).

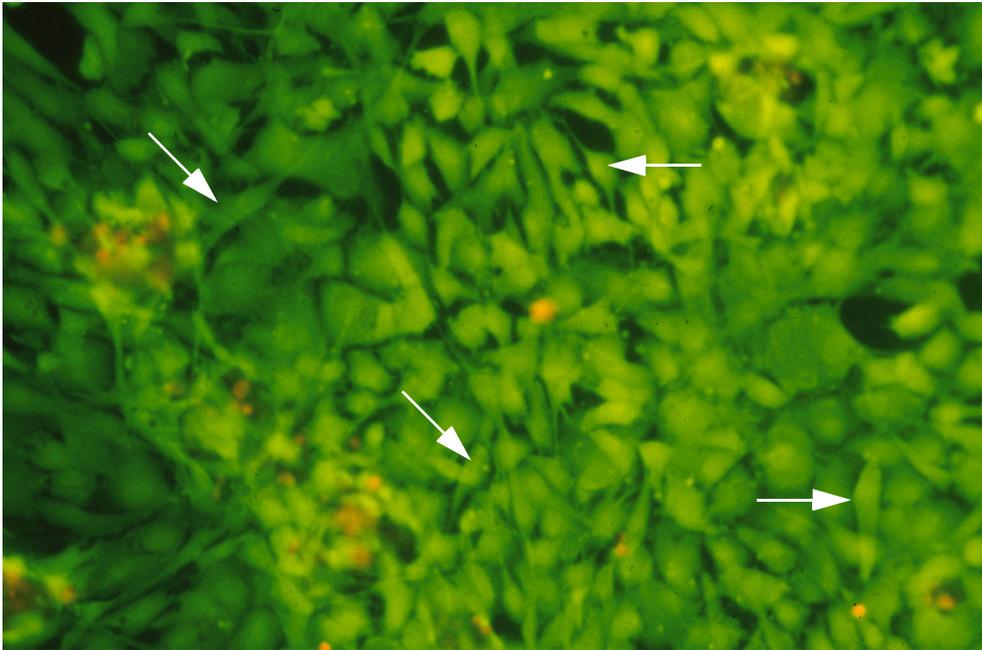


Abb. 6: Vitalitätsdarstellung von Chondrozyten mit Calcein-AM in der Monolayerkultur 13 Tage nach der Isolierung. Die Zellen zeigen die typischen morphologischen Veränderungen mit ihrer Spindelform und den Zellausläufern (→). Vitale Zellen sind leuchtend grün, abgestorbene Zellen rot markiert. Originalvergrößerung: x 320

3.1.2.2 Änderungen des Expressionsmusters

In der Monolayerkultur, in der die Zellen aus ihrem dreidimensionalen Verband gelöst sind, auf einer Fläche adhären und sich vermehren, ändert sich das Expressionsmuster der Zellen (Abb. 7). Nach 1 Woche bildet bereits ein Teil der Zellen das unspezifische Kollagen Typ I statt des Kollagen Typ II (Abb. 8). Nach 4 Wochen in der Monolayerkultur ist kein Kollagen Typ II mehr nachzuweisen, es wird ausschließlich Kollagen Typ I gebildet (Abb. 9).

Dieser Vorgang wird als Dedifferenzierung der Chondrozyten bezeichnet [Mark 1977].

Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Phänomen anhand von Doppelmarkierung von Kollagen Typ I und Typ II in der Monolayerkultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachgewiesen. Diese Änderung geht auch mit der morphologischen Veränderung der Chondrozyten einher.

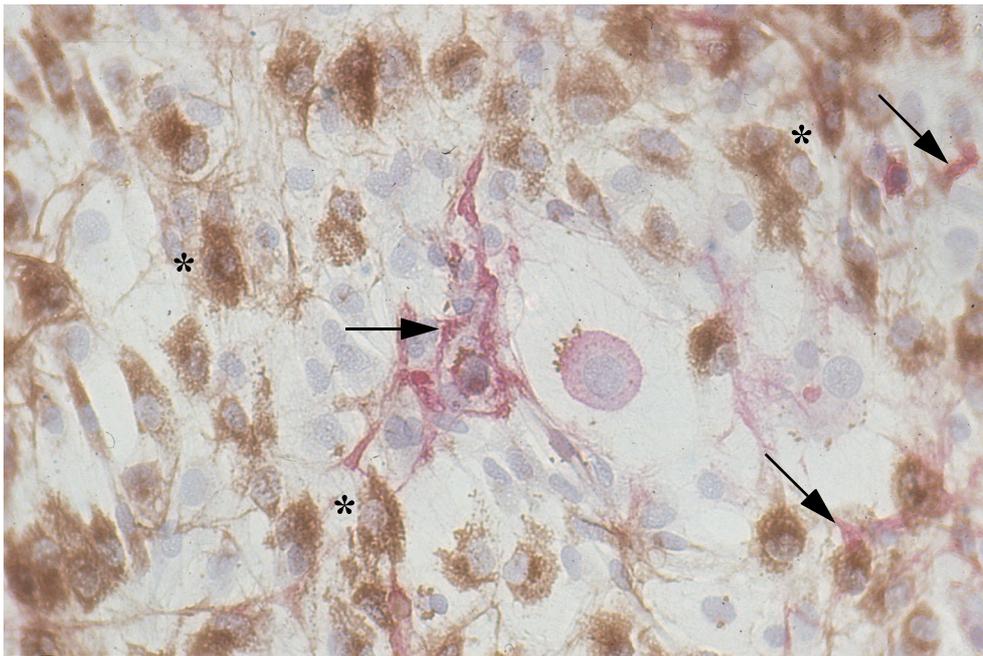


Abb. 7: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ I in braun (*) und Kollagen Typ II in rot (→) nach 13 Tagen in der Monolayerkultur. Beide Kollagentypen sind nebeneinander, intrazellulär nachweisbar. Originalvergrößerung: x 400.

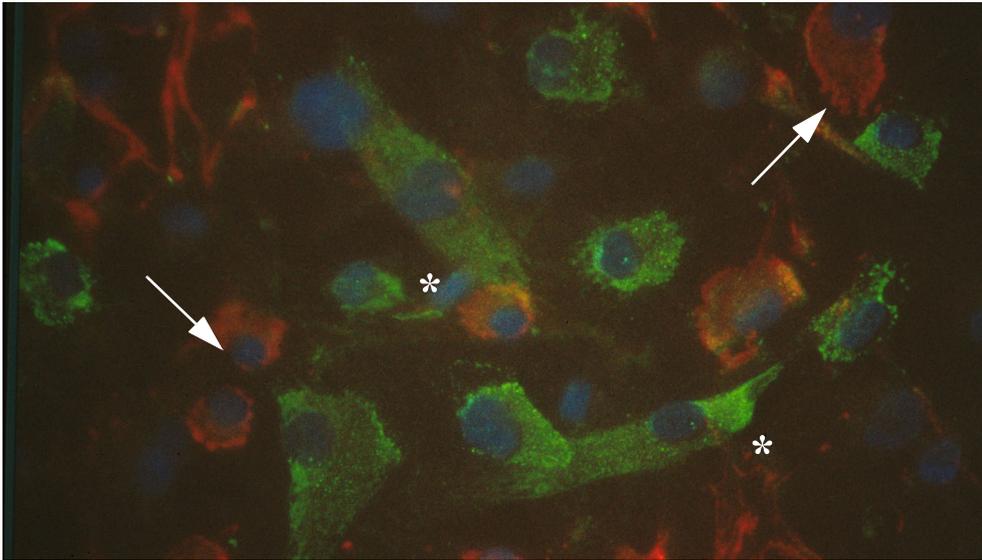


Abb. 8: Expressionsmuster der Chondrozyten nach 13 Tagen in der Monolayerkultur, der immunhistochemische Nachweis erfolgte mittels Fluochromen. Kollagen Typ II stellt sich rot dar (→), Kollagen Typ I grün (*). Die beiden Kollagen-Typen sind in unterschiedlichen Zellen nebeneinander nachweisbar, nicht innerhalb der selben Zelle. Originalvergrößerung: x 400.

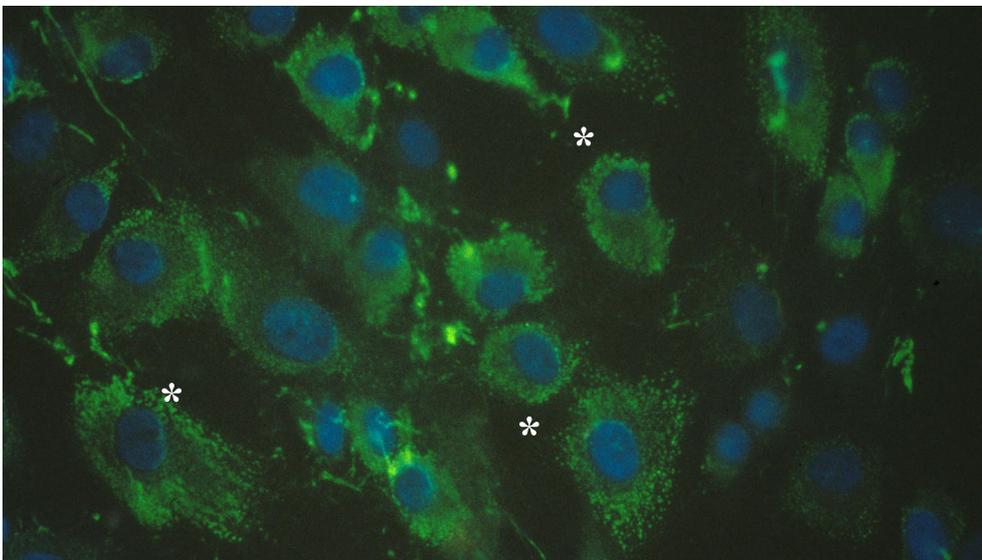


Abb. 9: Expressionsmuster der Chondrozyten nach 31 Tagen in der Monolayerkultur. Es kann ausschließlich das grün dargestellte Kollagen Typ I (*) nachgewiesen werden, der Nachweis von Kollagen Typ II ist negativ. Die Zellen sind vollständig dedifferenziert. Originalvergrößerung: x 400.

3.2 Entwicklung der Transplantate in vitro

Nach der letzten Passage wurden die Chondrozyten auf 10 x 10 x 2 mm große Proben von Hyaff[®]11 gesät und in einer in vitro-Kultur für weitere 32- 48 Tage kultiviert (siehe 2.4.2).

3.2.1 Zelladhäsion und Stabilität des Trägermaterials

Nach Einbringen der Chondrozyten in den Vlies-Proben wurde untersucht, wieviele der Zellen tatsächlich in dem Vlies adhärirten. Bei Zugrundelegen der ausgesäten Zellzahl wurden die im Überstand verbliebenen sowie die am Boden des Kulturgefäßes angehefteten Zellen abgezogen. Hierbei zeigte sich, daß 92-95% der Zellen im Vlies adhärirten.

Weiterhin zeigte sich ein Zusammenhang der Hydrolysierungs- und Degradationsprozesse der Vliese in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Zellen in der Kultur. Es zeigte sich eine Differenz des Medium-pH-Wertes. Dieser lag bei Hyaff[®]11 ohne Zellen in DMEM durchschnittlich bei pH 7,77, mit Zellen dagegen bei 7,91.

Die Hyaff[®]11-Chondrozyten-Proben konnten bis zu 48 Tage in wäßriger Mediumlösung kultiviert werden. Gegen Ende der Kulturzeit traten beim Trägermaterial Hydrolysezeichen auf, die zu einer Volumenzunahme der Fasern führte, die im Mikroskop deutlich sichtbar war. Zudem zerfiel das Material ab ca. dem 43. Tag in einzelne Fasern.

Im Gegensatz dazu blieben die Proben von Hyaff[®]11 ohne Chondrozyten nur für maximal 10 Tage in der DMEM-Lösung stabil, bevor sie sich in die einzelnen Fasern auflösten. Auch die Hydrolysezeichen traten entsprechend früher und ausgeprägter auf als bei den Hyaff[®]11-Chondrozyten-Proben.

3.2.2 Vitalität und Vermehrungsverhalten der Chondrozyten in Hyaff[®]11

Der Nachweis der Vitalität der Chondrozyten erfolgte mit Hilfe des Eukolight Viability/Cytotoxicity-Test-Kit der Firma MoBiTec. Bei diesem Test-Kit auf Fluoreszenzbasis werden die vitalen Zellen grün, die abgestorbenen Zellen dagegen rot markiert.

Die Proben wurden im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht und computergestützt dreidimensional rekonstruiert. Es wurden jeweils 10 Gesichtsfelder zufällig ausgewählt und die vitalen und abgestorbenen Zellen bestimmt (Abb. 10 und Abb. 11).

Es konnte gezeigt werden, daß die Vitalität der Chondrozyten auf Hyaff[®]11 während des gesamten Kultivierungszeitraumes von maximal 42 Tagen zwischen 92 und 98% lag.

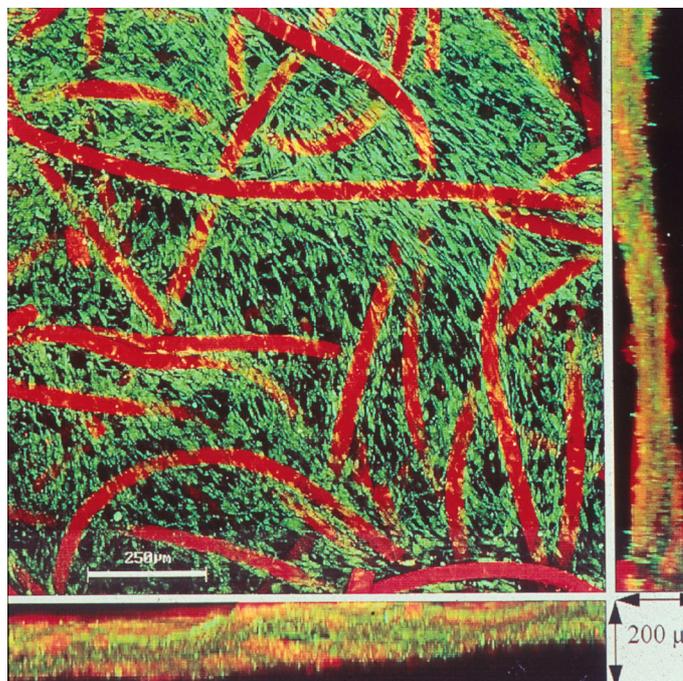


Abb. 10: Darstellung der Vitalität der Chondrozyten nach 33 Tagen in Kultur auf Hyaff[®]11 in der dreidimensionalen Rekonstruktion

Ergebnisse

im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Etwa 96% der Zellen sind vital und daher leuchtend grün markiert. Die restlichen ca. 4% sind avital und rot zu sehen. Es handelt sich um eine Übersichtsaufnahme in axialer und lateraler Projektion.

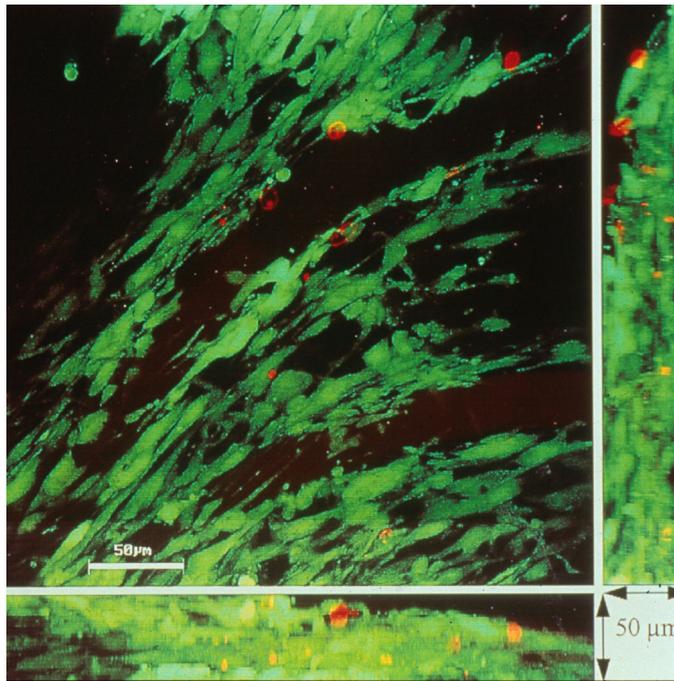


Abb. 11: Details aus Abb. 10. Es ist deutlich zu sehen, daß die Zellen zwischen den einzelnen Fasern Netzwerke bilden. Die vitalen Zellen erscheinen grün. Einige wenige sind avital, erkennbar an den rot markierten Zellkernen (→). Auch in der lateralen Betrachtung ist die sehr hohe Anzahl der grün markierten vitalen Zellen nach 33 Tagen in Kultur erkennbar.

Die Vermehrung der Chondrozyten ließ sich in Hyaff[®] 11 nicht ohne Probleme darstellen. Die üblichen Test-Kits mittels BrDU-Einlagerung oder dem Ki-67-Test waren wegen der Kreuzreaktionen von Hyaff[®] 11 mit Bestandteilen der Test-Kits nicht auswertbar. Es wurde daher auf die rein deskriptive Methode zurückgegriffen, repräsentative Bereiche der Vlies-Chondrozyten-Konstrukte über den Zeitraum der Kultur hinweg zu beobachten (Abb. 12)

Dabei zeigte sich eindeutig, daß die Zellzahl zunahm, da die Faserzwischenräume von den Chondrozyten ausgefüllt wurden und die Proben an Dichte zunahmen. Dies

Ergebnisse

deckt sich auch mit der makroskopischen Beobachtung, daß die Chondrozyten-Vlies-Transplantate in den ersten 2-3 Wochen der Kultur an Volumen zunehmen. Danach bleiben die Transplantate unverändert, bis nach 6 Wochen in vitro die Proben zerfallen.

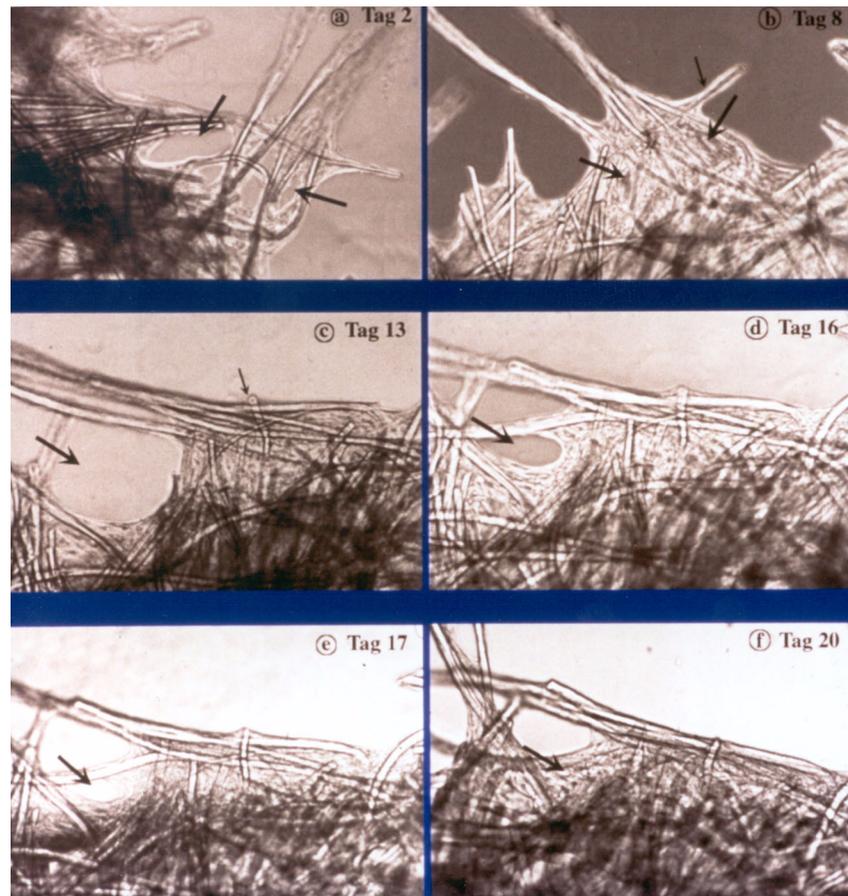


Abb. 12: Darstellung des selben Areals am Rand eines Chondrozyten-Vlies-Transplantates nach 2 (a), 8 (b), 13 (c), 16 (d), 17 (e) und 20 (f) Tagen in vitro. Die proliferierenden Chondrozyten füllen die Faserzwischenräume aus (→). Dies führt zum Teil zu Umlagerungen der Fasern und insgesamt zu einer Verdichtung des Transplantates. Teilweise ist zu sehen, daß Faseranteile, die nicht von Zellen besiedelt sind, aufgelöst werden (→). Originalvergrößerung: x 200.

3.2.3 Morphologie der Zellen

Die Morphologie der Chondrozyten im Vlies war zum Zeitpunkt der Aussaat spindelförmig und mit Zellausläufern ähnlich Fibrozyten. In der Elektronenmikroskopie ließen sich die Morphologie und die Zellverteilung im Vlies zu jedem Zeitpunkt der Kultur gut darstellen (Abb. 13 und Abb. 14).

Bis zum Ende der *in vitro*-Kulturzeit von etwa 42 Tagen blieb die Morphologie der Zellen unverändert spindelförmig. Die Chondrozyten bilden zwischen den Fasern Netzwerke, die durch Zellausläufer, die einen Kontakt zwischen den Zellen aufbauen, zusammengehalten werden. Eine extrazelluläre Matrixbildung war nicht nachweisbar.

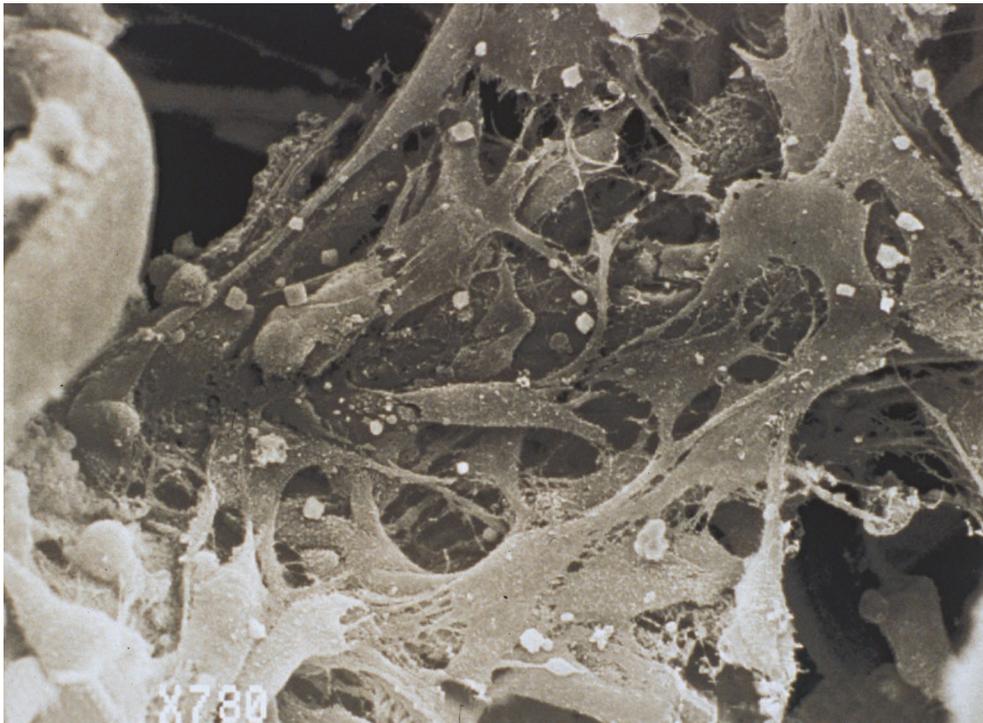


Abb. 13: Hyaff® 11-Chondrozyten-Probe nach 10 Tagen *in vitro*-Kultur in elektronenmikroskopischer Darstellung. Es ist deutlich eine fächerförmige Anordnung der Zellen zwischen den Fasern zu sehen. Die Zellausläufer stehen miteinander in Kontakt. Originalvergrößerung: x 780.

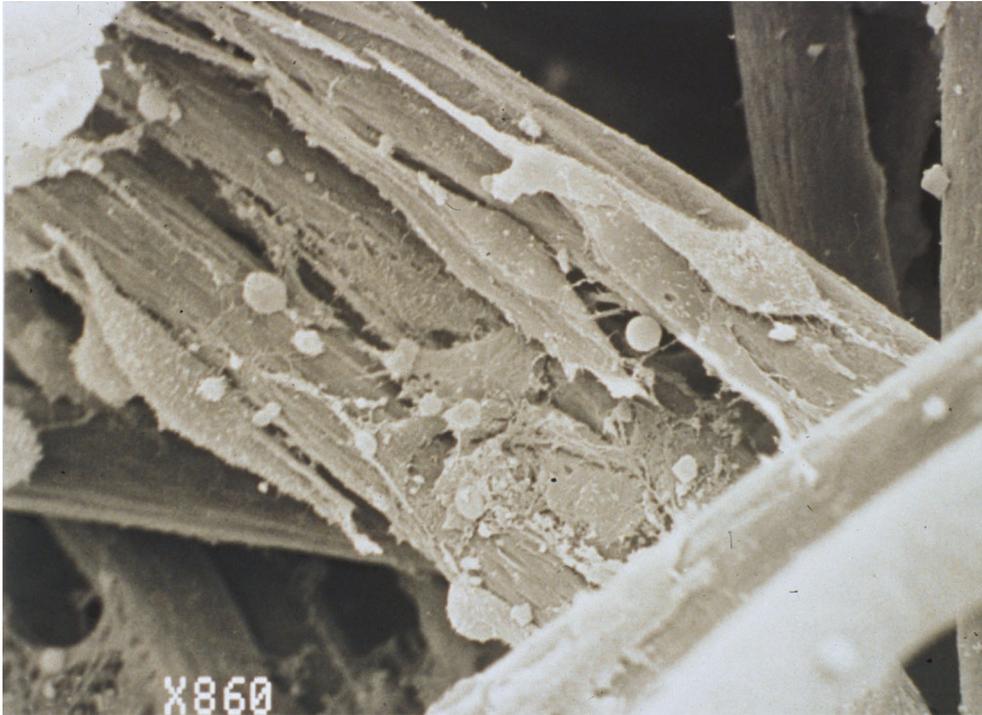


Abb. 14: Hyaff® 11-Chondrozyten-Probe nach 10 Tagen in vitro-Kultur in elektronenmikroskopischer Darstellung. Die spindelförmigen Zellen liegen den Fasern dicht an. Neben der Fibrozyten-ähnlichen Morphologie ist die gute Adhärenz der Zellen an den Fasern erkennbar. Originalvergrößerung: x 860.

3.2.4 Charakterisierung des Chondrozytenphänotypes

Wie bereits angesprochen, ist der Aufbau der extrazellulären Matrix für die Funktion des Knorpelgewebes von entscheidender Bedeutung. Das Phänomen der Dedifferenzierung der Chondrozyten tritt bei einer Isolierung der Zellen aus dem dreidimensionalen Matrixverband auf [Mark 1977, Benya 1982] und beschreibt den Verlust einer spezifischen Matrixbildung zugunsten der Teilungsfähigkeit der Zellen. Der aussagekräftigste Marker ist hierbei der Nachweis von Kollagen Typ II, dessen Produktion in der Monolayerkultur verschwindet und durch Synthetisierung von Kollagen Typ I ersetzt wird. Dieser Vorgang wird auch als Switch von Kollagen Typ II zu Kollagen Typ I bezeichnet.

Ergebnisse

Da die spezifischen Eigenschaften von Kollagen Typ II für die einzigartige Druckelastizität von Knorpelgewebe unersetzlich sind, ist es nun von entscheidender Bedeutung, wieder einen Switch von einer Kollagen Typ I-Produktion zurück zu einer Kollagen Typ II-Produktion zu erreichen, d.h. eine Redifferenzierung der Zellen einzuleiten.

Auch die weiteren Matrixbestandteile wie z.B. Chondroitinsulfat, Keratansulfat und andere Proteoglykane sind für die Funktion und den Wassergehalt des Gewebes wichtig.

3.2.4.1 Allgemeiner Nachweis von Kollagenen

Die Darstellung von Kollagenen im Gesamten erfolgte mit Hilfe der Azanfärbung. In der dreidimensionalen in vitro-Kultur von Chondrozyten auf Hyaff[®]11 waren während der gesamten Kulturzeit Kollagene nachweisbar, die allerdings vorwiegend intrazellulär zu finden waren. Eine extrazelluläre Matrixbildung sowie die typische Lakunenbildung fehlt (Abb. 15).

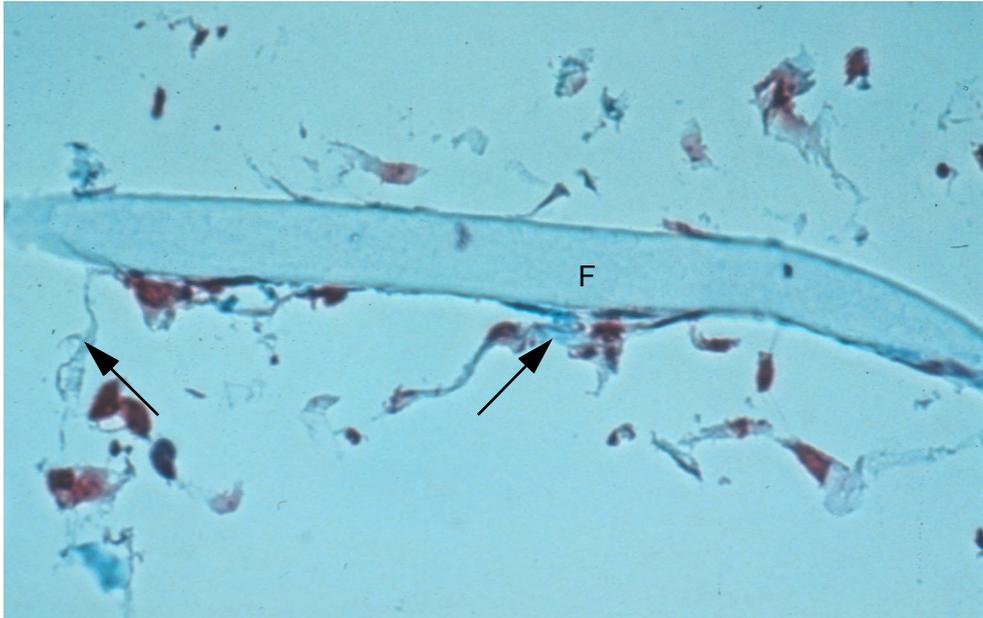


Abb. 15: Azanfärbung eines Kryostatschnittes einer Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Probe nach 14 Tagen in vitro. Die histochemisch nachgewiesenen Kollagene (blau) sind nur spärlich und ausschließlich intrazellulär zu finden (→). Die Zellen liegen der Faser (F) an, z.T. sind sie auch in der Umgebung zu finden und stehen über Zellausläufer miteinander in Kontakt. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 460.

3.2.4.2 Kollagen Typ II

Der Nachweis von Kollagen Typ II ist von zentraler Bedeutung, da das Wiederauftreten der Kollagen Typ II-Produktion der spezifische Marker für den Beginn der Redifferenzierung der Chondrozyten ist.

Es konnte nun in den immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, daß bei einer Kultivierung der dedifferenzierten Chondrozyten auf Hyaff[®] 11 in den ersten 10 Tagen noch kein Wiederauftreten der Kollagen Typ II-Produktion eintrat (Abb. 16).

Nach etwa 14 Tagen konnten erste, intrazellulär gelegene Kollagene vom Typ II nachgewiesen werden (Abb. 18 und Abb. 20). Auch in der folgenden Kulturzeit

Ergebnisse

wurde intrazellulär gelegenes Kollagen Typ II nachgewiesen. Eine extrazelluläre Anhäufung im Sinne einer Matrixbildung trat in vitro nicht auf (Abb. 22 , Abb. 23 und Abb. 21).

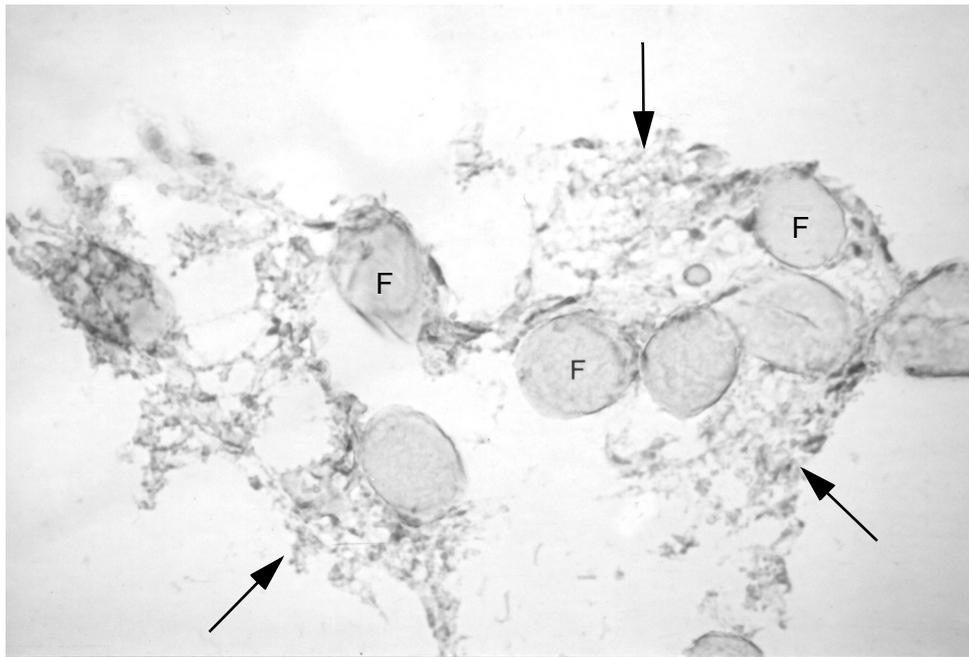


Abb. 16: Chondrozyten auf Hyaff[®] 11, kultiviert für 7 Tage in vitro. Die Zellen (→) sitzen an den Fasern, teilweise sind sie auch zwischen den Fasern (F) gelegen. Es ist kein spezifisches Kollagen Typ II nachweisbar. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 460.

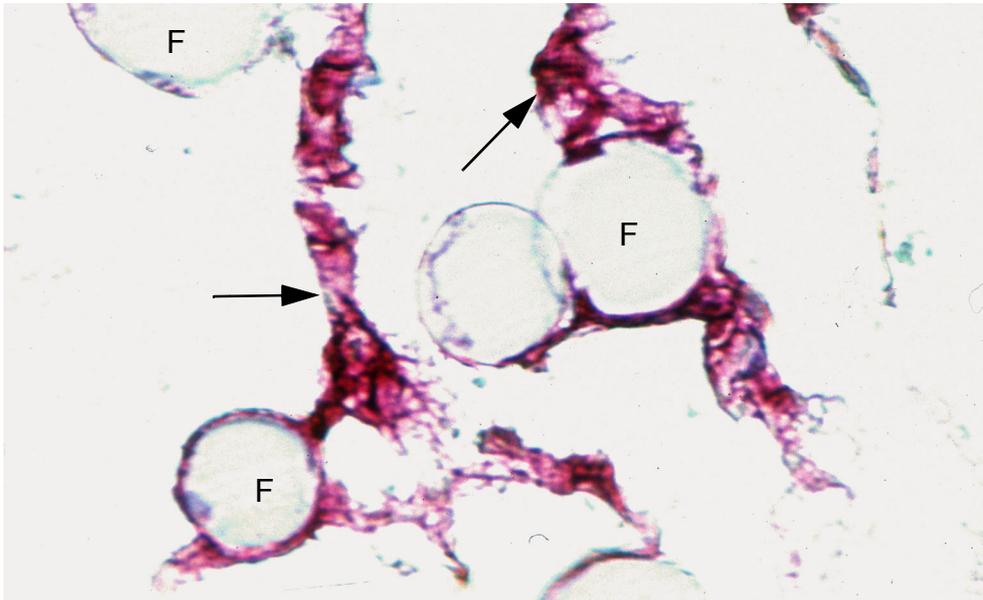


Abb. 17: Nachweis von intrazellulär gelegenem Kollagen Typ II nach 16 Tagen in Kultur auf Hyaff[®]11 mit dem Yoo-Antikörper, das in dieser Färbung rot erscheint (→). Die Chondrozyten sind an den Fasern adhärent und bilden zum Teil Netzwerke zwischen den Fasern. Die Fasern sind im Querschnitt getroffen (F). Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 460.

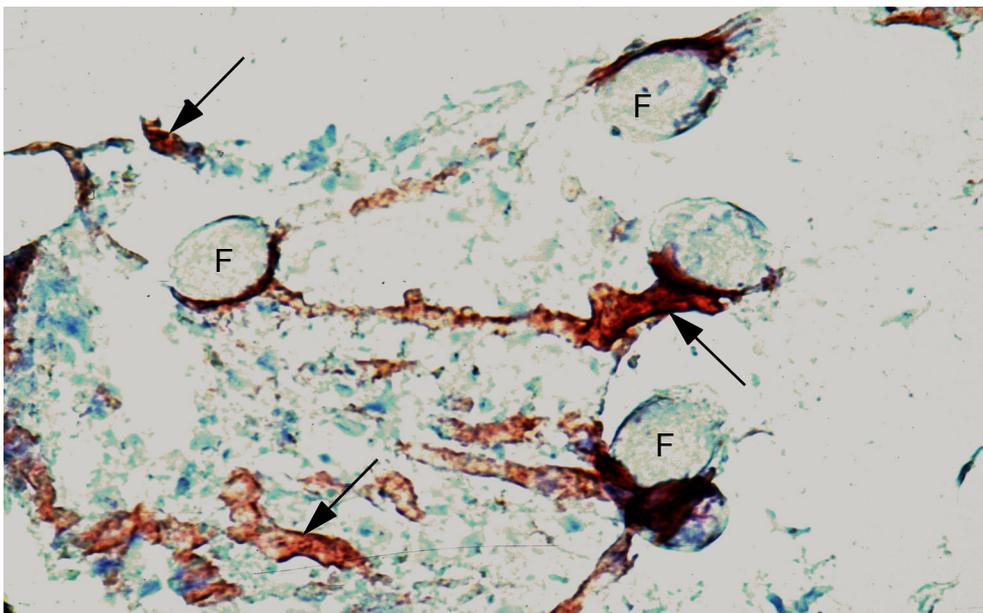


Abb. 18: Nachweis von intrazellulär gelegenem Kollagen Typ II nach 16 Tagen in Kultur auf Hyaff[®]11 mit dem Monosan-Antikörper PS-48, das in dieser Färbung rotbraun erscheint (→). Die

Ergebnisse

Chondrozyten sind an den Fasern adhären und bilden zum Teil Netzwerke zwischen den Fasern. Die Fasern sind im Querschnitt getroffen (F). Schnittdicke: 6 μm . Originalvergrößerung: x 460.

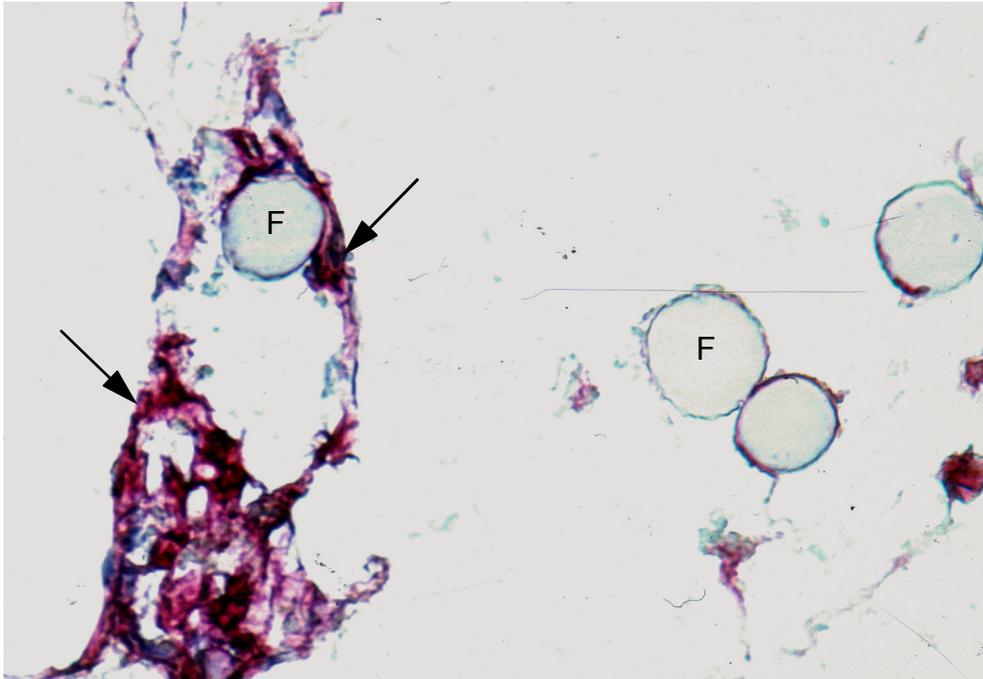


Abb. 19: Nachweis von Kollagen Typ II nach 28 Tagen in Kultur auf Hyaff[®] 11 mit Hilfe des Yoo-Antikörpers in roter Anfärbung. Das knorpelspezifische Kollagen Typ II ist weiterhin intrazellulär (→) nachweisbar, die Zellen sind teilweise adhären an den Fasern (F) und finden sich zum Teil in den Zwischenfaserräumen. Schnittdicke: 6 μm . Originalvergrößerung: x 460.



Abb. 20: Nachweis von Kollagen Typ II nach 28 Tagen in Kultur auf Hyaff[®] 11 mit Hilfe des Yoo-Antikörpers in roter Anfärbung. Das knorpelspezifische Kollagen Typ II ist weiterhin intrazellulär (→) nachweisbar, die Zellen sind teilweise adhären an den Fasern (F) und finden sich zum Teil zwischen den Fasern. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 460.

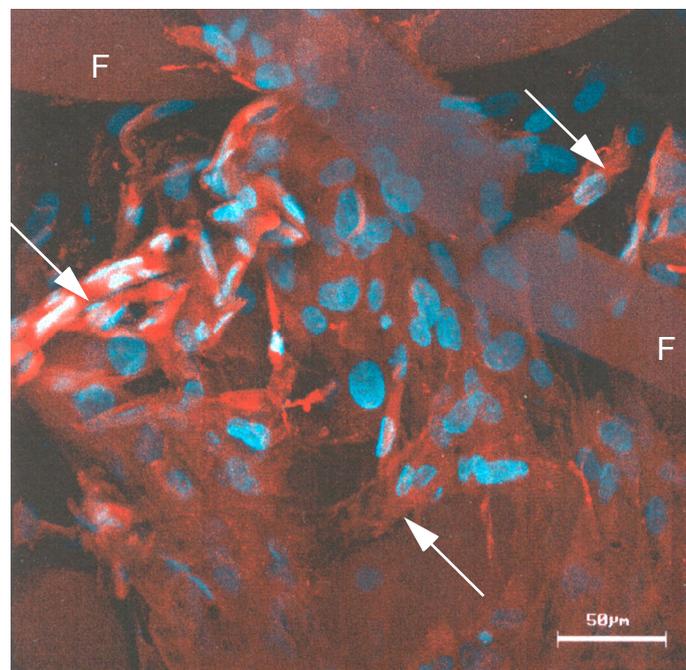


Abb. 21: Nachweis von Kollagen Typ II nach 33 Tagen in Kultur auf Hyaff[®] 11 mittels Fluoreszenzdarstellung in der CLSM. Das knorpelspezifische Kollagen Typ II ist intrazellulär (→) nachweisbar, die Zellen sind teilweise adhären an den Fasern (F) und finden sich z.T. in den Faserzwischenräumen.

3.2.4.3 Kollagen Typ I

Kollagen Typ I ist ein Kollagen, das in unterschiedlichen Bindegeweben (z.B. Perichondrium, Haut, Sehnen) vorkommt und vorwiegend von Fibrozyten gebildet wird. In der normalen Matrix von hyalinem Knorpelgewebe ist es nicht zu finden. Im Rahmen der Dedifferenzierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur tritt jedoch eine Produktion von Kollagen Typ I auf, die nicht wünschenswert ist, da Kollagen Typ I nicht die selben mechanischen Eigenschaften wie Kollagen Typ II hat.

In der dreidimensionalen Kultur von dedifferenzierten Chondrozyten auf Hyaff[®]11 wurde von Anfang der Kulturzeit an Kollagen Typ I nachgewiesen, das intrazellulär lag (Abb. 22 und Abb. 23). Diese Produktion blieb bis Ende der Kultur bestehen.

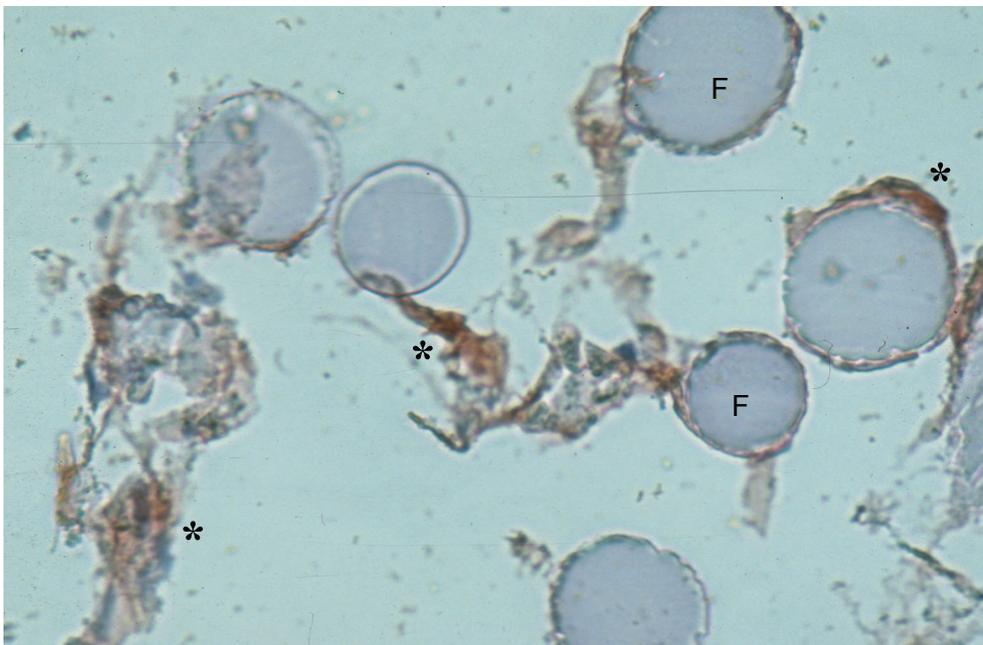


Abb. 22: Nachweis von Kollagen Typ I (*), rotbraun dargestellt, nach 16 Tagen in vitro-Kulturzeit. Das Kollagen liegt intrazellulär, die Zellen haften an den Fasern (F) an. Schnittdicke: 6 μ m. Originalvergrößerung: x 460.

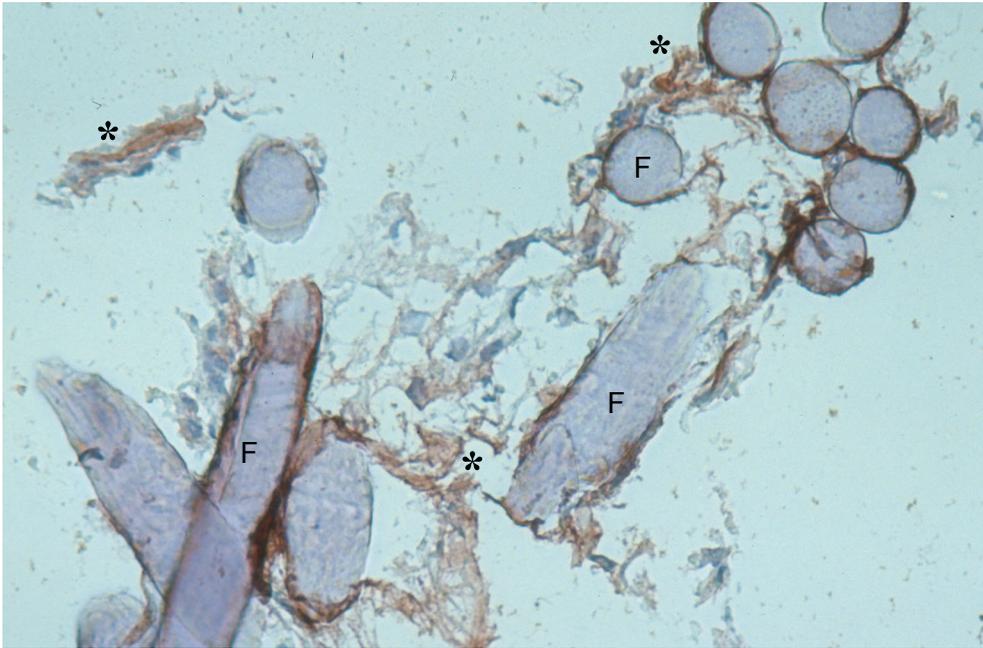


Abb. 23: Der intrazelluläre Nachweis von Kollagen Typ I (*) ist nach 28 Tagen in vitro-Kultivierung des Chondrozyten-Hyaff® 11-Transplantates eindeutig positiv. Es gibt keinen Hinweis auf einen Rückgang der Produktion. Deutlich ist zu sehen, daß die Zellen Netzwerke zwischen den Fasern (F) bilden. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 360.

3.2.4.4 Chondroitinsulfat

Chondroitinsulfate gehören zu der Klasse der Glykosaminoglykane und kommen in großer Menge v.a. im Knorpelgewebe vor, in dem sie bis zu 40% der Trockensubstanz ausmachen können. Daneben sind sie auch in Bindegeweben, der Haut und der Hornhaut nachweisbar.

In der dreidimensionalen in vitro Kultur der dedifferenzierten Chondrozyten auf Hyaff® 11 waren die Chondroitinsulfate nur vereinzelt und spärlich nachweisbar (keine Abbildung).

3.2.4.5 Keratansulfat

Keratansulfat ist ein Glykosaminoglykan, das im menschlichen Organismus ausschließlich in Knorpel und Cornea vorkommt. In vitro ließ es sich nicht nachweisen (keine Abbildung).

3.2.4.6 Safranin-O

Mit Hilfe der Safranin-O-Färbung werden Glykosaminoglykane und Proteoglykane nachgewiesen. In den in vitro-Präparaten waren die Färbungen negativ über den gesamten Kulturzeitraum hinweg (keine Abbildung).

3.2.4.7 Alcianblau

Mit Hilfe der Alcianblau-Färbung werden Glykosaminoglykane und Proteoglykane nachgewiesen. In den Präparaten der in vitro-Kultur waren die Färbungen negativ über den gesamten Kulturzeitraum hinweg (keine Abbildung).

3.3 Chondrozyten-Hyaff[®] 11-Transplantate in vivo

3.3.1 Untersuchung der Stabilität der Transplantate

Die Transplantate wurden in athymischen Nacktmäusen für 4 und 12 Wochen (je 4 Proben) subcutan implantiert. Während der gesamten in vivo-Phase trat keine Resorption der Transplantate auf, ebenso keine Infektion von Transplantaten oder Tieren.

Die Transplantate blieben in Form und Größe (Abb. 24) weitestgehend stabil, es ließ sich lediglich eine Zunahme der Dicke beobachten.

Ergebnisse

Auch in der orientierenden mechanischen Untersuchung verhielten sich die Transplantate ähnlich hyalinem Knorpel, ebenso beim Zerteilen mit dem Skalpell.

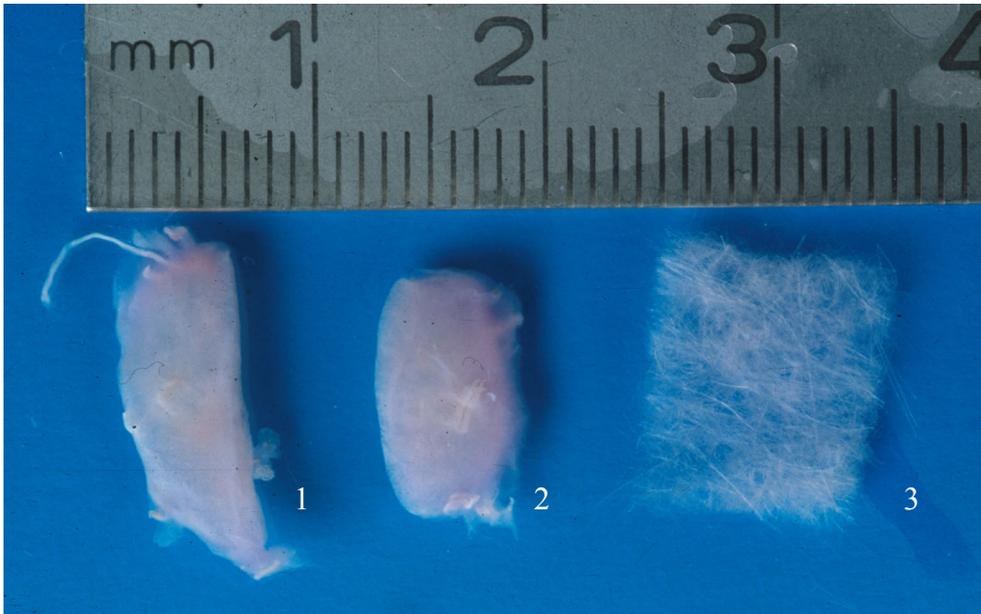


Abb. 24: Die Chondrozyten- Hyaff® 11-Transplantate (Nr. 1 und 2) nach subcutaner Implantation für 4 Wochen. Die Proben sind vor den Aufnahmen halbiert worden, da ein Teil in den Laboratorien der Fidia Advanced Biopolymers Srl (Abano Terme, Italien) verblieb, in denen dieser Teil der Tierversuche durchgeführt wurde. Nr. 3 ist eine Probe von reinem Hyaff® 11 in der Größe 10 x 10 x 2 mm, d.h. doppelt so groß. Bereits makroskopisch fällt die wesentlich höhere Dichte der Transplantate im Vergleich mit denen der in vitro-Kultur auf.

3.3.2 Morphologie der Chondrozyten

In der histologischen Untersuchung der Knorpeltransplantate zeigte sich ein fester Verband aus Zellen, Matrix und Vliesfasern. Die Konstrukte erwiesen sich in der elektronenmikroskopischen Untersuchung als sehr dicht, einzelne Zellen konnten nicht dargestellt werden (keine Abbildung).

In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich, daß die Zellen innerhalb einer Matrix liegen. Ihre Morphologie entspricht nicht vollkommen der rund-ovalen Form

Ergebnisse

von Chondrozyten im normalen Knorpelgewebe, unterscheidet sich jedoch deutlich von den fibroblasten-artigen Zellen der Monolayerkultur. Die Interzellulärsubstanz bildet sich zunehmend zwischen den Zellen aus, drängt diese auseinander und bildet so Lakunen, in denen die Zellen liegen. Nur wenige der Zellen stehen noch über Zellausläufer in Kontakt. Vereinzelt sind Mitosefiguren nachweisbar. (Abb. 25 und Abb. 26).

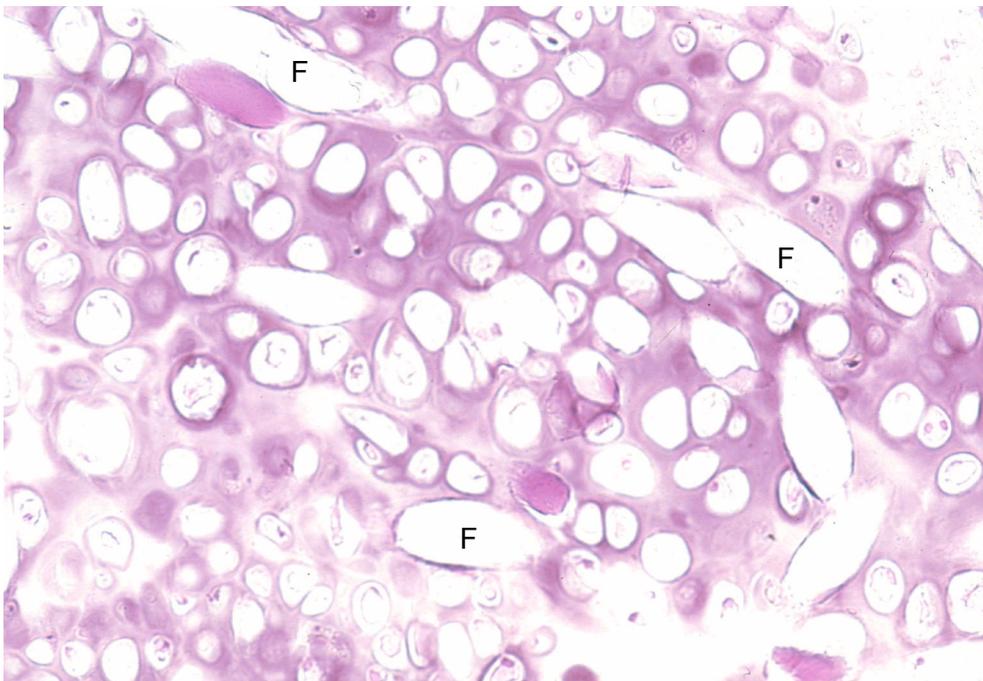


Abb. 25: Hämatoxyllinfärbung eines histologischen Schnittes eines Transplantates nach 12 Wochen subcutaner Implantation. Die Morphologie der Zellen ist sehr variabel, sie liegen alle in Lakunen von Matrix umgeben. Die Fasern (F) liegen inmitten der Grundsubstanz, sie sind aufgrund der Schnitttechnik größtenteils als Hohlraum erkennbar. Schnittdicke: 6 μm . Originalvergrößerung: x 320.



Abb. 26: Im Detail aus Abb. 25 ist die rund-ovale Form der Zellen gut zu sehen. Es findet sich eine Mitosefigur (M). Der typische basophile Hof um die Lakunen (L), wie er bei nativem Knorpelgewebe zu finden ist, fehlt. Faser: F.
Schnittdicke: 6 μ m. Originalvergrößerung: x 460.

3.3.3 Allgemeiner Nachweis von Kollagenen

In dieser Azanfärbung sind die mikroanatomischen Strukturen sehr gut beurteilbar. In der Gegenüberstellung von nativem Septumknorpel und Hyaff[®]11-Chondrozyten-Transplantaten nach 4 und 12 Wochen subcutaner Implantation zeigt sich, daß die Qualität der Transplantate verglichen mit dem Knorpel deutlich geringer ist. Die Fasern nehmen auch nach 12 Wochen Implantationszeit einen unverändert großen Anteil der Extrazellulärsubstanz ein.

Ergebnisse

Die Zellen selber liegen in Lakunen, stehen z.T. aber auch über Zellausläufer in Kontakt, oder eine Lakune ist von mehreren Chondrozyten besiedelt. Bemerkenswert ist jedoch die ausgeprägte Dichtezunahme der Matrix im Vergleich der Transplantate nach 4 und 12 Wochen. Dies spricht für eine langsame Ausreifung der Matrixproduktion und ist damit als Hinweis auf die beginnende Redifferenzierung der Zellen anzusehen (Abb. 29, Abb. 30, Abb. 31 und Abb. 32). Zum Vergleich wurde eine Azanfärbung von nativem Knorpelgewebe beigefügt (Abb. 27 und Abb. 28).

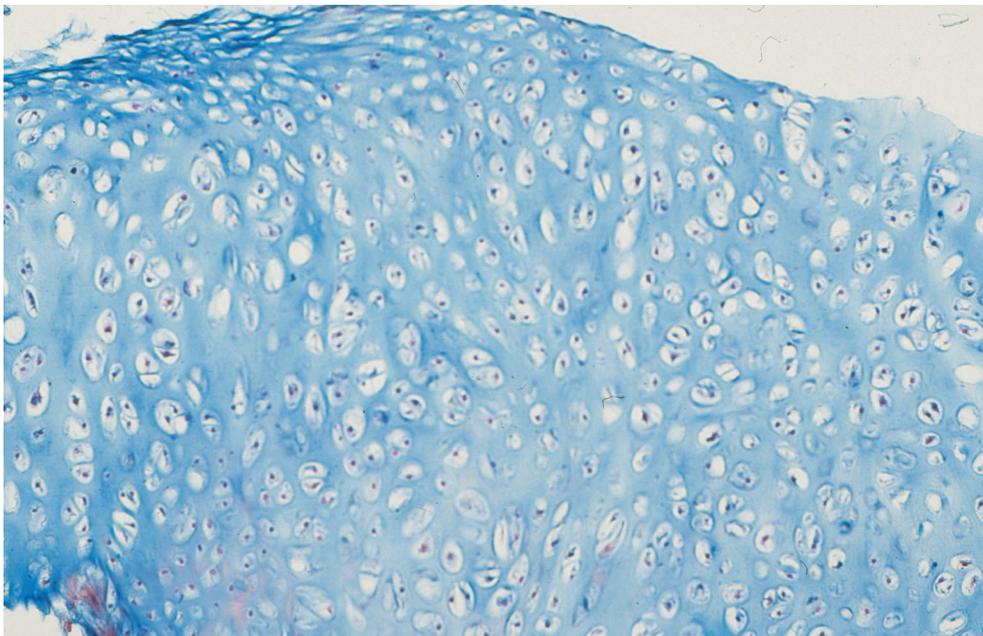


Abb. 27: Nativer humaner Septumknorpel in einer Azanfärbung. Die Kollagene der Matrix sind leuchtend blau zu sehen, die Zellkerne rot markiert. Zu sehen ist die gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Matrix. Schnittdicke: 6 μ m. Originalvergrößerung: x 260.

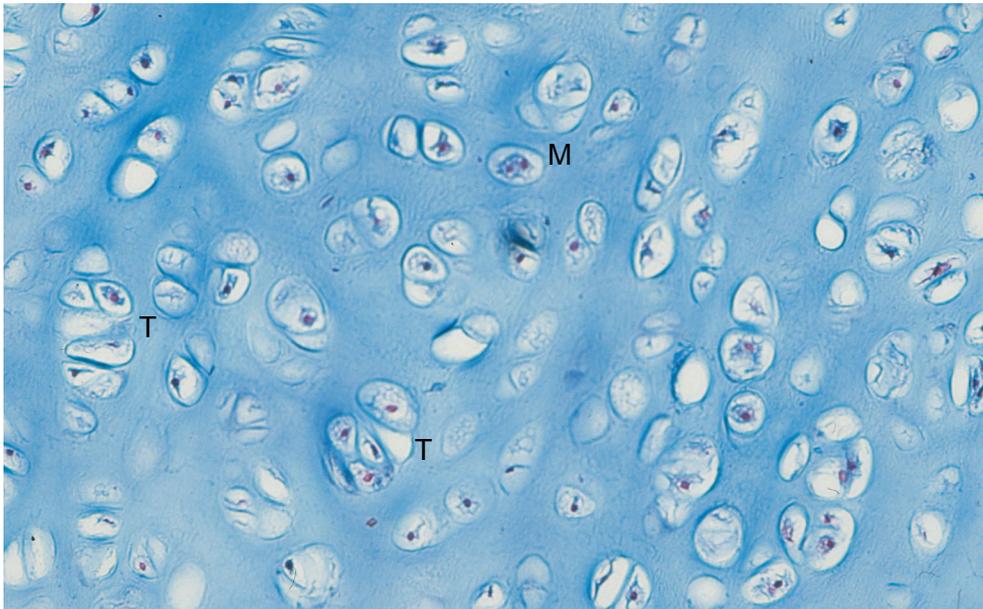


Abb. 28: Detail aus Abb. 27. Die Chondrozyten im nativen Knorpelgewebe liegen frei innerhalb der Lakunen. Die Verteilung der Lakunen in Territorien ist erkennbar (T). Auch hier finden sich Mitosefiguren (M). Schnittdicke: 6 μm . Originalvergrößerung: x 320.

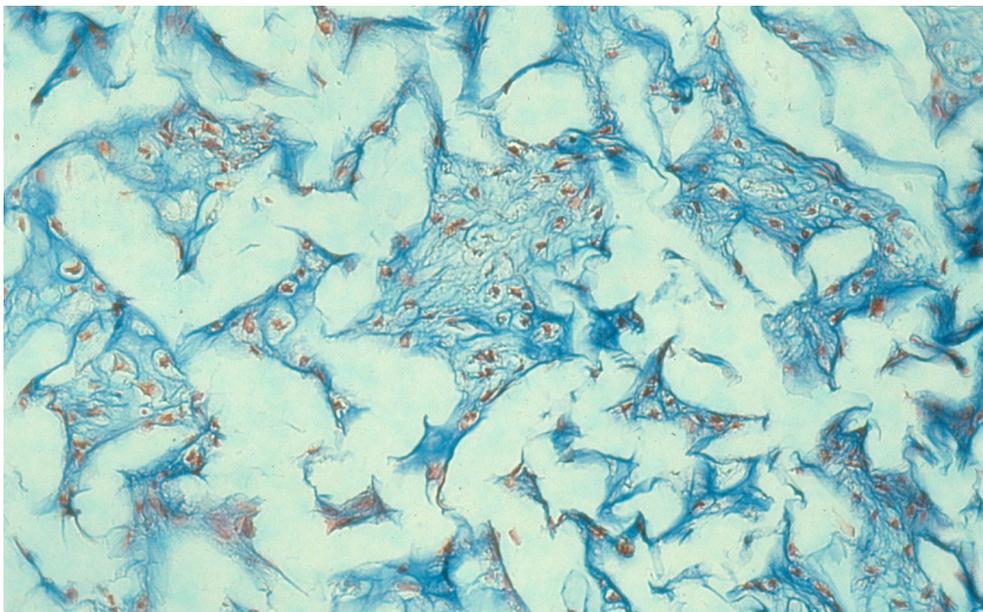


Abb. 29: Azanfärbung eines Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Transplantates nach 4 Wochen subcutaner Implantationszeit. Die Kollagenfasern (blau) nehmen eine geringere Fläche als im nativen Gewebe ein,

Ergebnisse

die Verteilung erscheint deutlich lockerer. Eine Lakunenbildung ist im Ansatz vorhanden. Die Zellverteilung ist unregelmäßig, es findet sich keine Strukturierung der Mikroanatomie im Sinne einer Territorienbildung. Schnittdicke: 6 μm .
Originalvergrößerung: x 280.

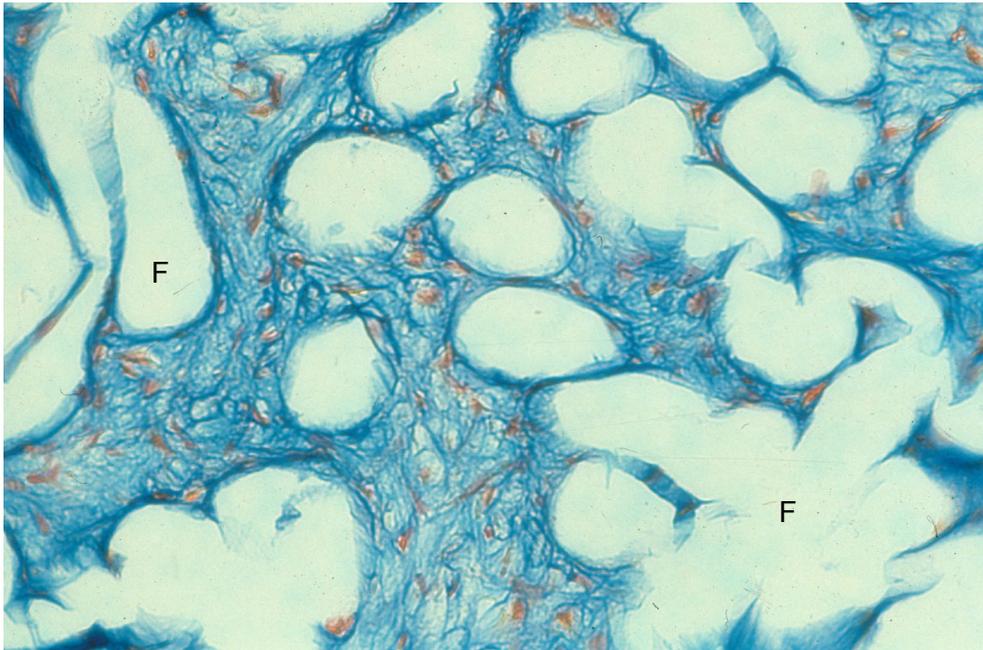


Abb. 30: Im Detail aus Abb. 29 ist das zarte Kollagenfaser-Geflecht zu sehen. Es scheint weniger dicht als bei nativem Knorpelgewebe zu sein (Abb. 27 und Abb. 28). Teilweise scheinen die Zelle untereinander über Ausläufer in Kontakt zu stehen. Die Fasern (F) sind als Hohlräume zu sehen. Schnittdicke: 6 μm .
Originalvergrößerung: x 320.

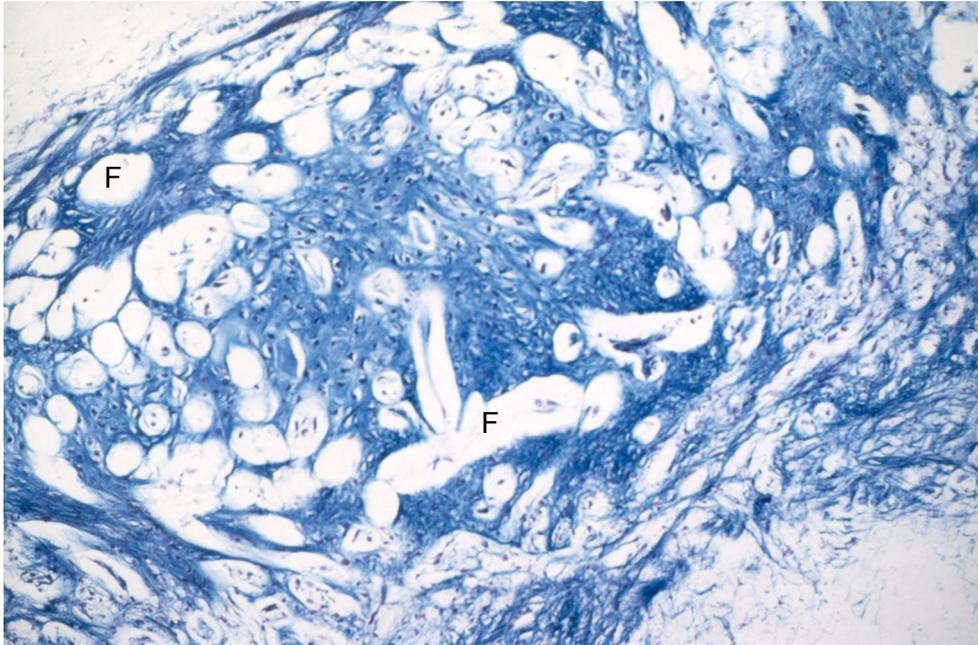


Abb. 31: Azanfärbung eines Hyaff[®]11-Transplantates nach 12 Wochen in vivo-Kultivierung. Die im Schnitt ausgelösten Flächen entsprechen den Fasern der Hyaff[®]11-Vliesfasern (F). Die leuchtend blaue Matrix zwischen den Fasern entspricht den Kollagenfasern im Präparat, die Zellkerne sind rot gefärbt. Es ist sichtbar, daß die Matrix den Freiraum zwischen den Fasern vollständig ausfüllt und diese förmlich einmauert. Die Zellen liegen in Lakunen. Die Verteilung erscheint wesentlich unruhiger als im nativen Knorpel (Abb. 27 und Abb. 28), eine spezifische Binnenarchitektur oder Gliederung in Territorien fehlt. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 200.

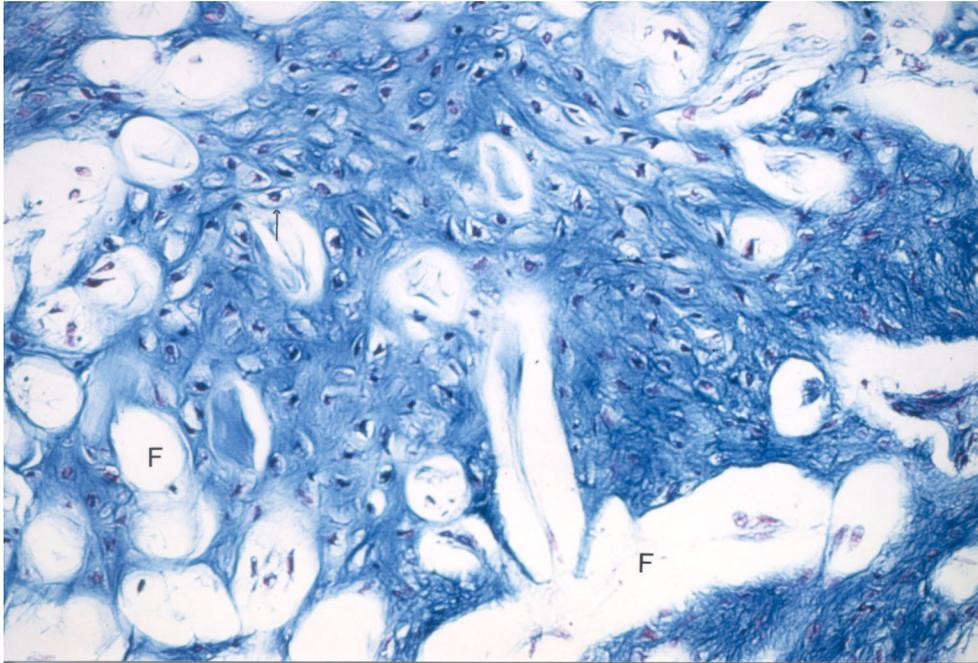


Abb. 32: Im Detail aus Abb. 31 erscheint die Extrazellulärmatrix deutlich dichter bei gleicher Schnittdicke der Präparate (6 μm). Die Zellkerne sind rot markiert, die Fasern (F) als Hohlräume erkennbar. Originalvergrößerung: x 280.

3.3.4 Kollagen Typ II

Typischerweise ist innerhalb des gesunden, nativen Knorpelgewebes ausschließlich Kollagen Typ II nachweisbar. Kollagen Typ I ist ein Bestandteil von Bindegewebe und kommt u.a. im Perichondrium vor (Abb. 33). Es gilt als Marker für die Dedifferenzierung der Chondrozyten nach Amplifizierung, wohingegen das Wiederauftreten von Kollagen Typ II als Hinweis auf eine Redifferenzierung angesehen wird. Eine Darstellung dieser Kollagen Typen ist daher von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung des entstandenen Gewebe.

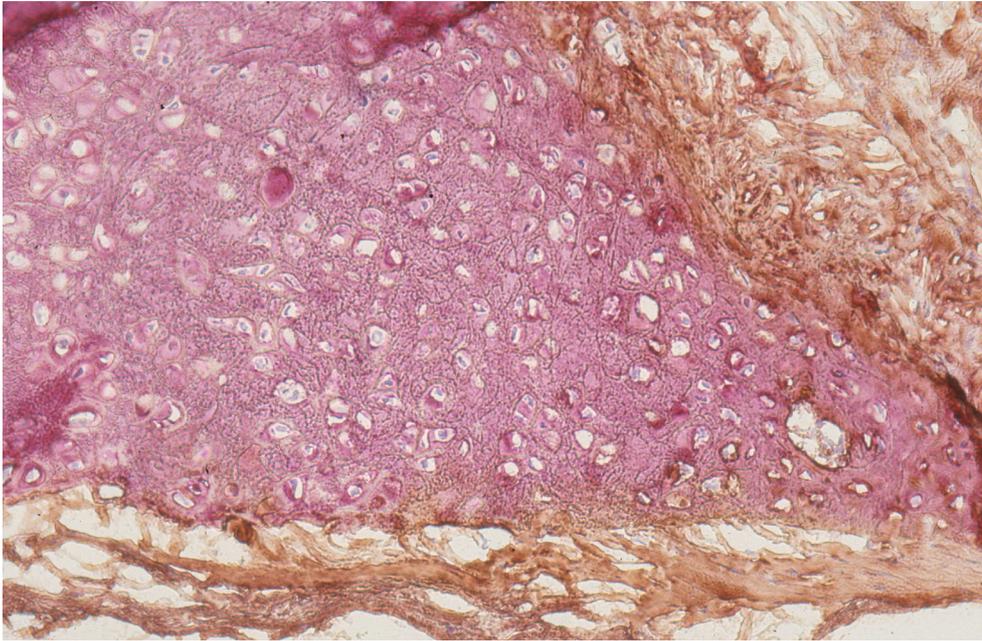


Abb. 33: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ II in rot und Kollagen Typ I in braun in einem Schnitt von humanem Septumkorpel. Es ist deutlich zu erkennen, daß Kollagen Typ II ausschließlich innerhalb der Matrix zu finden ist, Kollagen Typ I findet sich strikt auf das Perichondrium beschränkt. Schnittdicke: 6 μm . Originalvergrößerung: x 260.

Dem Nachweis von Kollagen Typ II als dem wichtigsten Marker der Redifferenzierung der Chondrozyten wurde ein besonderes Gewicht beigemessen. Es konnte nach subcutaner Implantierung bereits nach 4 Wochen wie auch nach 12 Wochen mit Hilfe der Immunhistochemie in der Fluoreszenz-Methode nachgewiesen werden (Abb. 34, Abb. 36 und Abb. 38).

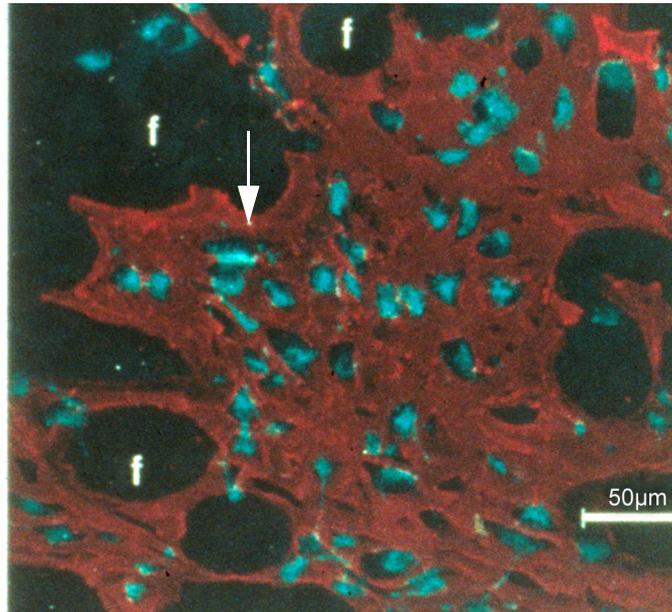


Abb. 34: Nachweis von Kollagen Typ II in einem Hyaff[®] 11-Transplantat nach 4 Wochen in vivo im CLSM mittels der indirekten Fluoreszenz-Methode. Die Zellkerne sind mit Hilfe des Hoechst 33258 Farbstoffes blau markiert, das Kollagen Typ II erscheint leuchtend rot (→). Die Matrix zwischen den Zellen ist dicht, die Zellen liegen in Lakunen. Fasern: f. Schnittdicke: 30 μ m.

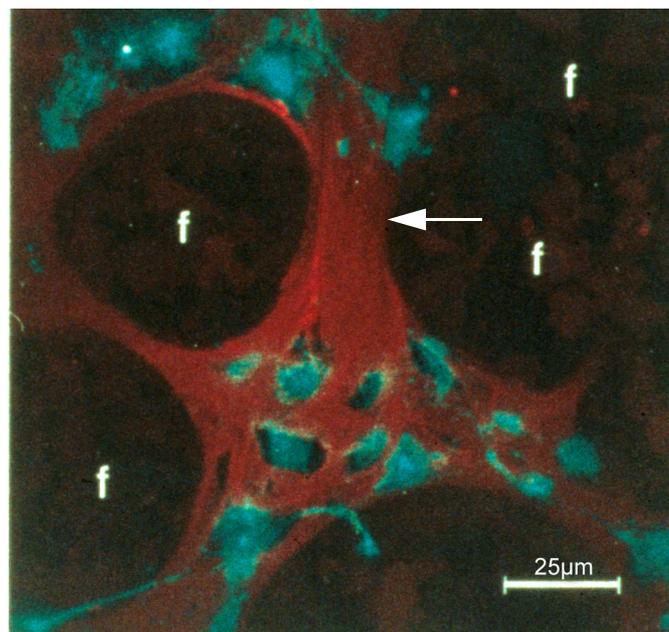


Abb. 35: Detail aus Abb. 34. Die Zellen sind gut in den Lakunen liegend zu sehen, umgeben von einer Matrix aus Kollagen Typ II (→). Fasern: f, Schnittdicke: 30 μ m.

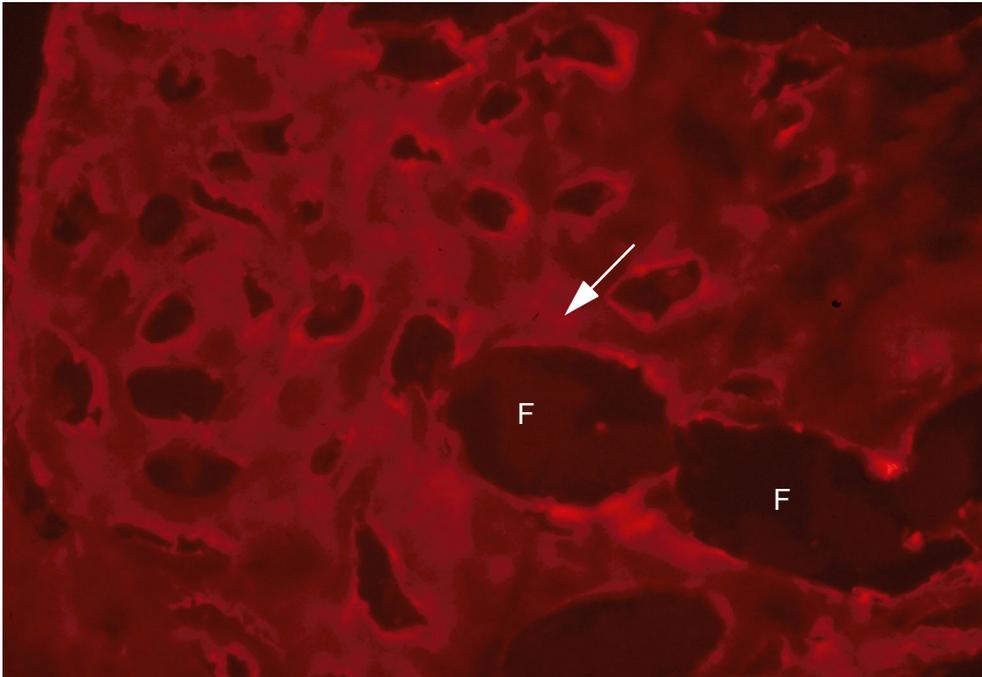


Abb. 36: Auch nach 12 Wochen in vivo-Kultivierungszeit ist der Nachweis von Kollagen Typ II eindeutig positiv, hier in der konventionellen Mikroskopie in leuchtend roter Fluoreszenz dargestellt (→). Es finden sich Faserreste (F), eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte nicht. Schnittdicke: 30 μm . Originalvergrößerung: x 320.

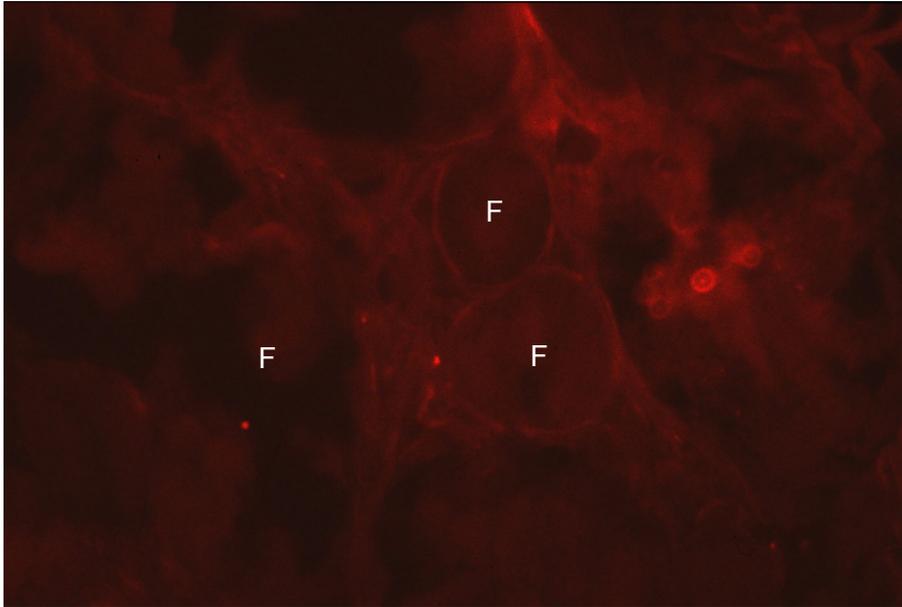


Abb. 37: Abbildung einer Negativkontrolle, die unter exakt den selben Bedingungen hergestellt wurde. Es wurde lediglich auf den Primärantikörper verzichtet. Es ist zu sehen, daß zwar in sehr geringem Maße eine Autofluoreszenz besteht, die jedoch deutlich unter der Fluoreszenz der Abb. 36 liegt. Schnittdicke: 30 μm . Originalvergrößerung: x 320.

3.3.5 Kollagen Typ I

Das Kollagen Typ I, das als Marker für die Dedifferenzierung der Chondrozyten gilt, war während des gesamten Kultivierungszeitraumes in der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie nachweisbar (Abb. 38). Es waren nach 4 Wochen subcutaner Implantierungszeit Areale zu finden, die vollständig frei von Kollagen Typ I sind (Abb. 39). Ein Hinweis auf einen Rückgang der Produktion nach 12 Wochen zeigte sich nicht (Abb. 40).

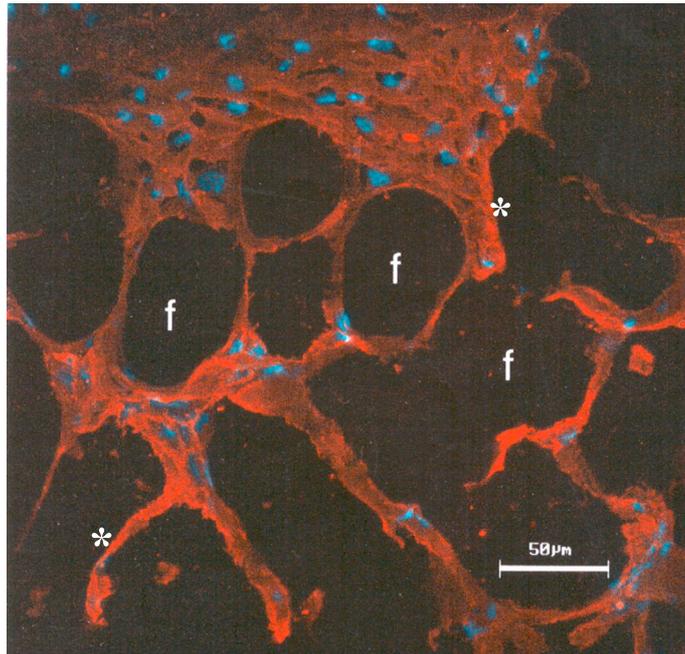


Abb. 38: Nachweis von Kollagen Typ I (*) mittels indirekter Fluoreszenz-Methode rot dargestellt in der CLSM eines Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Transplantates nach 4 Wochen in vivo. Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33258-Farbstoff in blau. Fasern: f. Schnittdicke: 30 μm.

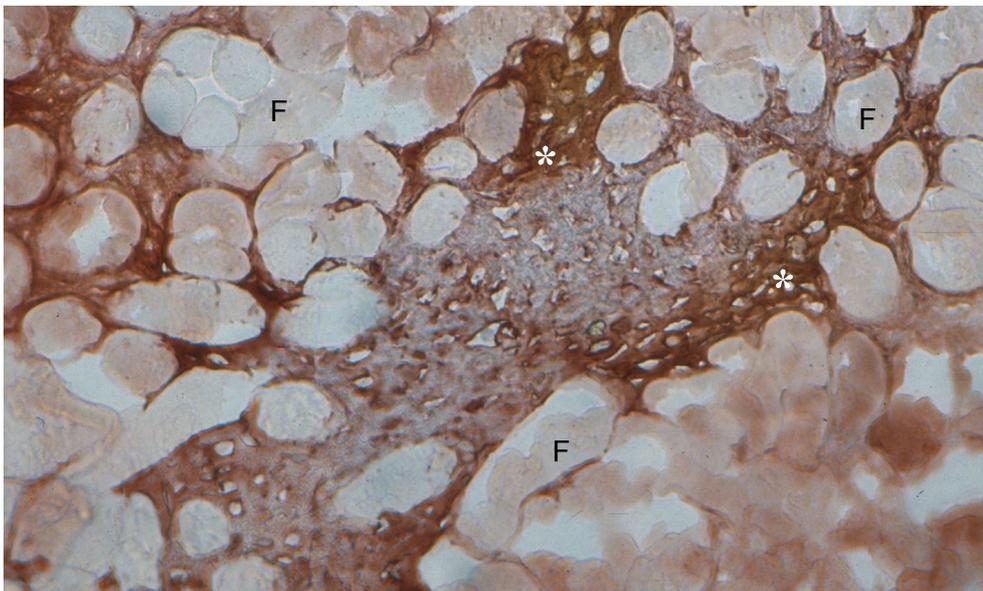


Abb. 39: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ I (*), hier braun markiert, in einem Gewebeschnitt eines Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Transplantates nach 4 Wochen subcutaner Implantation. Zu sehen sind weitere Areale, in denen keinerlei Kollagen Typ I nachweisbar ist. Faser (F). Schnittdicke: 10 μm. Originalvergrößerung: x 260.

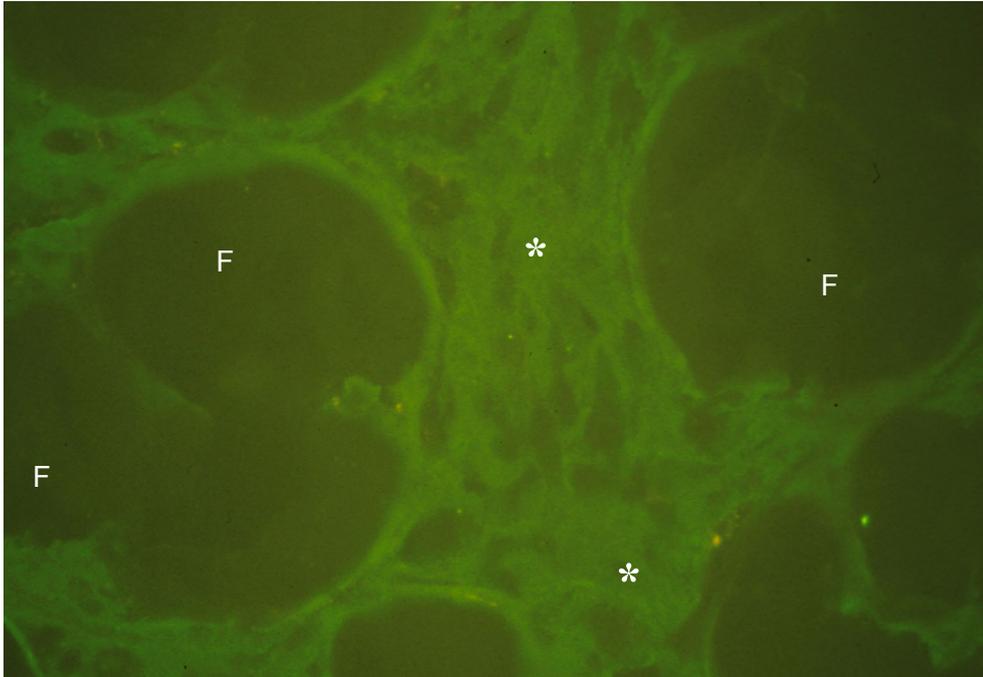


Abb. 40: Nachweis von Kollagen Typ I (*) innerhalb eines Transplantates nach 12 Wochen subcutaner Implantierung mittels der indirekten immunhistochemischen Fluoreszenz-Markierung. Das Kollagen Typ I ist leuchtend grün dargestellt. Faser: F. Schnittdicke: 20 μm . Originalvergrößerung: x 460.

3.3.6 Chondroitinsulfat

Der Nachweis von Chondroitin-Sulfat wurde stellvertretend für die Klasse der Glykosaminoglykane angesehen. Diese machen einen der drei Hauptbestandteile neben Hyaluronsäure und Kollagenen in Trockensubstanz der nativen Knorpelmatrix aus. Der Nachweis innerhalb der Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Transplantate erfolgte mittels der indirekten Peroxidase-Methode und war nach 4 und 12 Wochen subcutaner Kultivierung schwach positiv (Abb. 41).

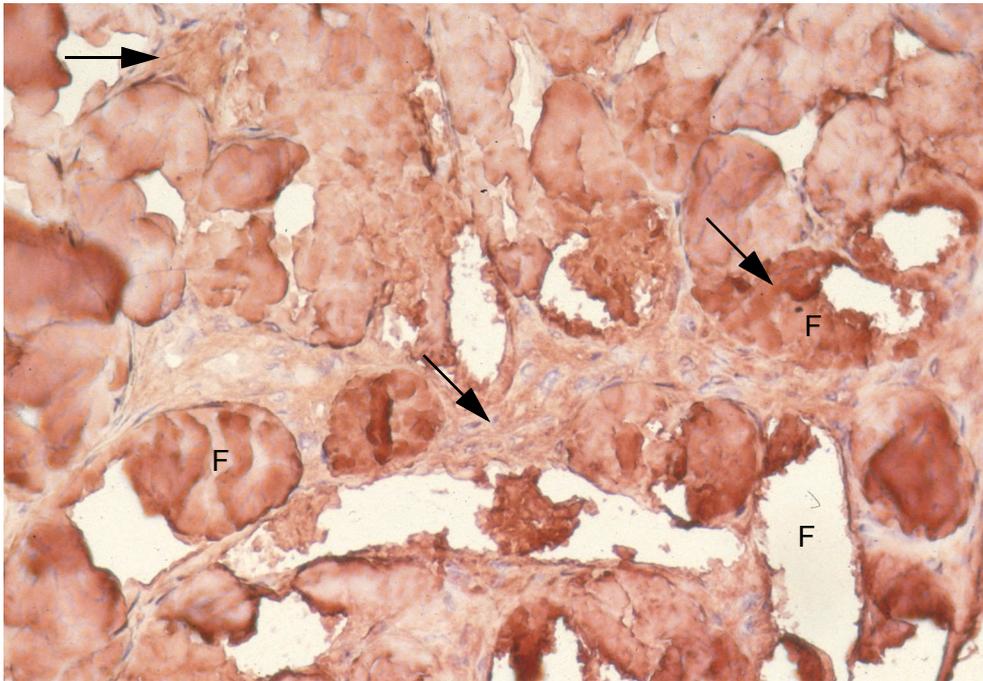


Abb. 41: Nachweis von Chondroitinsulfat (→) innerhalb eines Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Transplantates nach 4 Wochen subcutaner Implantierung. Das exprimierte Chondroitinsulfat ist rötlich markiert und sowohl in der Interzellulärsbstanz als auch an den Zerfallsrändern der Fasern (F) zu erkennen. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 320.

3.3.7 Keratansulfat

Das Glykosaminoglykan, das ausschließlich in Knorpelgewebe und Cornea nachweisbar ist, ist ebenfalls ein spezifischer Teil der Matrix. Es ließ sich zu jedem Zeitpunkt der *in vivo* Kultur darstellen (Abb. 42).

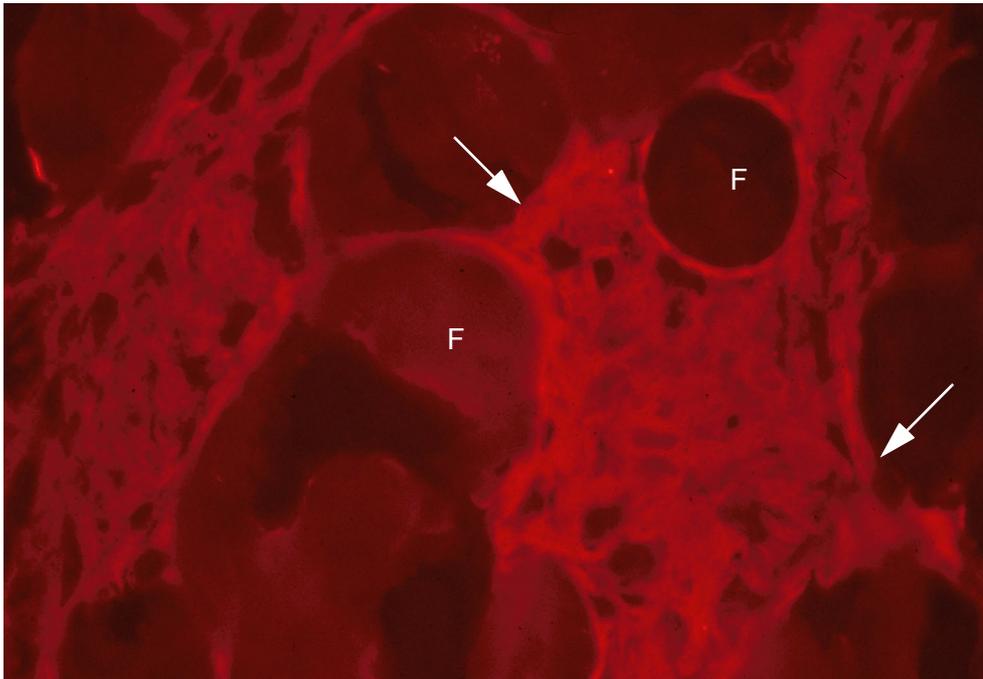


Abb. 42: Ein Chondrozyten-Hyaff[®] 11-Transplantat nach 12 Wochen in vivo. Das exprimierte Keratansulfat wurde mittels Fluoreszenz-Farbstoff leuchtend rot dargestellt (→). Der Nachweis war über allen Arealen der exprimierten Matrix positiv. Die Kerne sind blau markiert, Reste der Fasern z.T. vorhanden (F).
Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 320.

3.3.8 Safranin O

Die Safranin O-Färbung ist der allgemeine histochemische Nachweis von Glykosaminoglykanen als einem weiteren wichtigen Bestandteil der Knorpelmatrix. Diese war ebenfalls zu jedem Zeitpunkt der in vivo Kultivierung innerhalb der Hyaff[®] 11-Chondrozyten-Transplantate nachweisbar (Abb. 43)

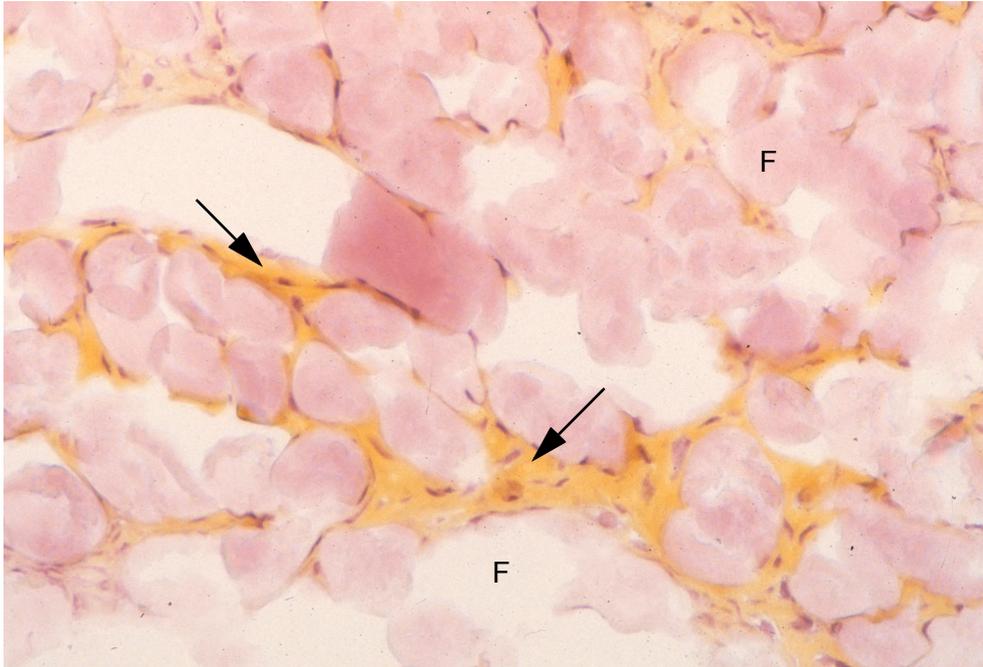


Abb. 43: Safranin O-Färbung eines Hyaff[®]11-Transplantates nach 4 Wochen in vivo. Die Glykosaminoglykane innerhalb der Matrix wurden mit dieser Färbung leuchtend gelb markiert (→), zwischen den Fasern (F) liegend. Die Zellkerne sind rötlich angefärbt. Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 260.

3.3.9 Alcianblau

Diese Färbung dient zum allgemeinen Nachweis von Glykosaminoglykanen. Diese waren ebenfalls zu jedem Zeitpunkt der in vivo-Kultivierung innerhalb der Hyaff[®]11-Chondrozyten-Transplantate nachweisbar (Abb. 44).

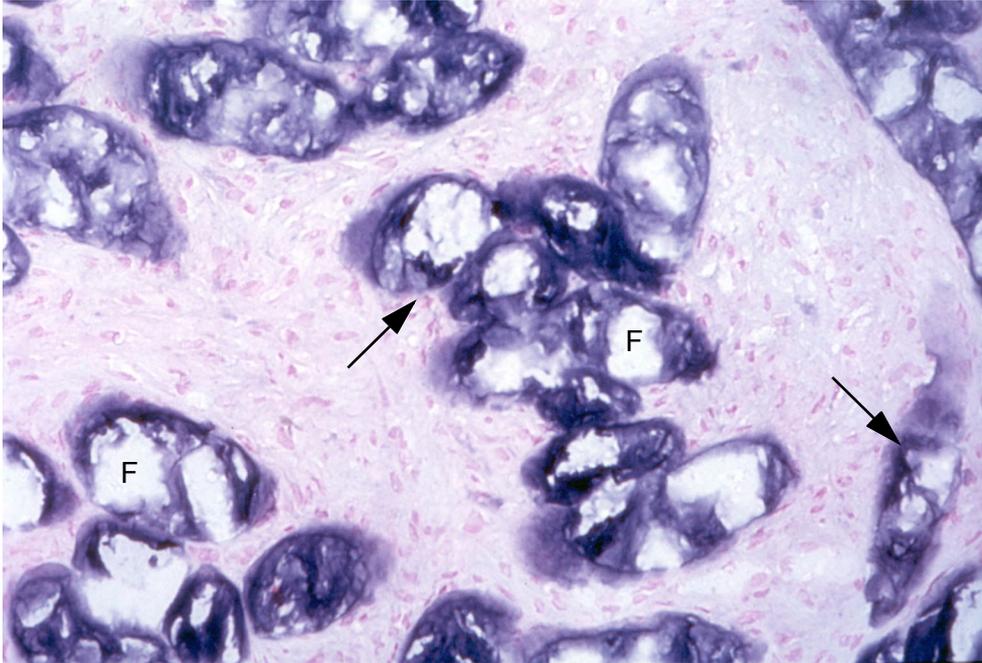


Abb. 44: Alcianblau-Färbung eines Hyaff[®] 11-Transplantates nach 4 Wochen in vivo. Die Glykosaminoglykane und sauren Proteoglykane innerhalb der Matrix wurden mit dieser Färbung leuchtend blau markiert (→). Fasern (F). Schnittdicke: 6 µm. Originalvergrößerung: x 260.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Humane Chondrozyten können aus einer kleineren Probe aus dem Nasenseptum isoliert und in der Monolayerkultur zur Proliferation angeregt werden, um eine größere Zellzahl zu erreichen. Die humanen Chondrozyten verlieren nach der Isolierung in der Monolayerkultur die Fähigkeit, Kollagen Typ II zu exprimieren. Statt dessen tritt eine Produktion von Kollagen Typ I auf. Gleichzeitig ändert sich die Morphologie von rund-oval zu spindelförmig, die ähnlich der von Fibrozyten ist.
- Nach der Aussaat im Biomaterial Hyaff[®] 11 adhärirt der Großteil der Zellen (92-95%) innerhalb des Vlieses. In vitro zeigen die Chondrozyten eine hervorragende Vitalität (92-98%) über den gesamten Kulturzeitraum von bis zu 48 Tagen. Die Zellmorphologie bleibt unverändert spindelförmig. Kollagen Typ II

Ergebnisse

kann nach 16 Tagen in vitro intrazellulär nachgewiesen werden. Kollagen Typ I bleibt bis Ende der Kulturzeit intrazellulär nachweisbar. Die Produktion der Matrixbestandteile Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Glykosaminoglykane und saurer Mukopolysaccharide ist in vitro negativ (Tab. 3). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von bis zu 42 Tagen wird keine extrazelluläre Matrix aufgebaut.

- In vivo bleiben die Transplantate formstabil über den gesamten Kulturzeitraum von bis zu 12 Wochen. Die Transplantate werden dicht, sind druckelastisch und erinnern an hyalinen Knorpel. Es werden extrazellulär die typischen Bestandteile einer Knorpelmatrix (Kollagen Typ II, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Glykosaminoglykane und saure Mukopolysaccharide) nachweisbar. Die Chondrozyten liegen innerhalb von Lakunen. Teilweise sind Hinweise auf Proliferation zu erkennen. Kollagen Typ I bleibt bis zum Ende der in vivo-Kultur nachweisbar (Tab. 3).

Tabelle 3: Exprimierung der nachgewiesenen Matrixbestandteile in vitro und in vivo.

	In vitro-Proben nach 4 Wochen Kulturzeit	In vivo-Proben nach 12 Wochen Kulturzeit
Kollagen Typ II	+	+++
Kollagen Typ I	+	++
Chondroitinsulfat	-	+++
Keratansulfat	-	+++
Safranin O	-	++
Alcianblau	-	++

4 Diskussion

Das Tissue-Engineering von autologem Knorpelgewebe könnte für die Rekonstruktive Chirurgie ein vielversprechendes Verfahren werden, um größere Knorpeldefekte mit einer minimalen Hebedefekt morbidity zu heilen [Aigner 2000]. Der Aufbau der vorliegenden Arbeit und sämtliche im experimentellen Design der Untersuchungen wurden im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz gewählt.

4.1 Differenzierungsverhalten von Chondrozyten in der Amplifikationsphase

In der hier verwendeten Methode des Tissue-Engineering humaner adulter Chondrozyten wird aus einer kleinen Gewebeprobe eine möglichst große Anzahl von Zellen gewonnen, die dann gemäß den klinischen Voraussetzungen zur Deckung eines größeren Defektes expandiert werden müssen. Dieser entscheidende und unerlässliche Faktor wird in vergleichbaren Studien häufig nicht berücksichtigt [Aigner 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen humaner adulter nasoseptaler Chondrozyten mit dem Trägermaterial Hyaff[®]11 und dessen Eignung für das Tissue-Engineering von humanem Knorpelgewebe untersucht.

Die Anzahl von Chondrozyten, die aus einer Probe isoliert werden kann, ist abhängig von der Probengröße und der individuellen Zelldichte. In dieser Experimentenreihe betrug sie $2,8 \pm 1,2 \times 10^5$ bei einer Probengröße von ca. $0,1 - 0,3 \text{ cm}^3$.

In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, eine große Anzahl von humanen Chondrozyten in vitro zu gewinnen [Solursh 1991,

Diskussion

Bujia 1995a+b]. Eine Vermehrung der Zellzahl um den Faktor 10^6 innerhalb von 8 Wochen ist möglich, in dieser Zeit ist kein Abfall der Proliferationsaktivität feststellbar. Es ist jedoch nicht zu erwarten, daß eine unbegrenzte Vermehrung stattfinden kann [Hayflick 1965].

Es wurden bislang keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten in Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht nachgewiesen [Sittinger 1994].

Bei den vorliegenden Experimenten wurde lediglich eine Vermehrung um den Faktor 40 durchgeführt. Einmal war dies eine ausreichende Zellzahl, zum anderen soll mit einer steigenden Passagenzahl auch eine Minderung des Redifferenzierungspotentials einhergehen [Osch 2001].

Die Amplifikation geht jedoch mit einem Verlust der hochspezialisierten Funktion der Matrixproduktion der Chondrozyten her. Dieser Vorgang wird als Dedifferenzierung bezeichnet. Marker für die Dedifferenzierung ist der Verlust der Expression des knorpeltypischen Kollagen Typ II und die Bildung von Kollagen Typ I, das in normalem Knorpelgewebe nicht zu finden ist [Desmukh 1976, Benya 1978].

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte das Phänomen der Dedifferenzierung beobachtet werden. Nach einer Amplifizierungsphase der Chondrozyten von 13 Tagen waren Kollagen Typ I und II noch koexprimiert. Nach 31 Tagen war keinerlei Produktion des knorpeltypischen Kollagen Typ II mehr zu beobachten, lediglich Kollagen Typ I wurde gebildet. Die Zellen waren dedifferenziert.

Der entscheidende Schritt beim Tissue-Engineering von Knorpelgewebe ist eine Einleitung der Redifferenzierung der Zellen. Die genauen Mechanismen, die zu den Phänomenen der Dedifferenzierung sowie der Redifferenzierung führen, sind bislang nur wenig bekannt. Ein Faktor ist die erneute Anordnung im dreidimensionalen Zellverband [Cima 1991, Vacanti 1991, Puelacher 1994, Park 1995, Bujia 1995a, Cao 1997, Aigner 2000, Osch 2001]. Die Zellen werden hierfür in eine Trägerstruk-

tur eingebracht, die eine dreidimensionale Anordnung und damit eine Redifferenzierung der Zellen ermöglicht.

4.2 Beurteilung des entstandenen Gewebe

4.2.1 Die Entwicklung der Hyaff[®]11-Chondrozyten-Transplantate in vitro

Die Chondrozyten wurden nach der Amplifikationsphase (Dauer: 35 ± 8 Tage) in der Monolayerkultur in das Vlies eingebracht. Innerhalb von 4 - 6 Stunden adhärirte der Großteil der dedifferenzierten Zellen ($90 \pm 2,5\%$). Die Konstrukte wurden im weiteren Verlauf zellreicher und damit dichter. Dies spricht für ein Persistieren der Proliferationsaktivität. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Chondrozyten in der dreidimensionalen Struktur nach 16 Tagen wieder beginnen, Kollagen Typ II als Marker der Redifferenzierung intrazellulär zu bilden. Kollagen Typ I wurde ebenfalls weiterhin intrazellulär synthetisiert. Eine Bildung anderer typischer Matrixbestandteile wie z.B. Chondroitinsulfat, Keratansulfat oder Mukoproteine konnte nicht nachgewiesen werden. Die Zellen waren innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 42 Tagen nicht in der Lage, eine extrazelluläre Matrix aufzubauen. Dies ist als spezifische Funktion des Knorpelgewebes unerlässlich, und ein Fehlen spricht für ein Defizit der Zellen. Beispielsweise ist auch in der Pathologie von Arthrose eine Reduktion der Knorpelmatrix ein entscheidender Faktor.

Die Proben wurden nach längstens 42 Tagen instabil. Durch Hydrolyse lösten sich die Fasern auf, durch die fehlende Matrix konnte der dreidimensionale Zellverband nicht aufrechterhalten werden.

Dies alles spricht dafür, daß in vitro keine vollständige Redifferenzierung der Chondrozyten erreicht werden konnte. Aufgrund der dreidimensionalen Anordnung der Zellen sowie der guten Eigenschaften des Biomaterials wurde der Impuls zur Redifferenzierung gegeben, der sich jedoch in vitro als nicht ausreichend erwies.

4.2.2 Die Entwicklung der Hyaff® 11-Chondrozyten-Transplantate in vivo

Die Implantation der Hyaff® 11-Proben erfolgte nach 3 Wochen in vitro-Kultur. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in einem Stadium der inkompletten Redifferenzierung. In der Vorstellung des "Bioreaktors Mensch" wären die optimalen Umgebungsbedingungen für eine vollständige Redifferenzierung gegeben. Um eine solche Anwendung zu etablieren, wurde die Technik an einem Tiermodell überprüft. Ein gut geeignetes Modell für die Transplantation von xenogenem, humanem Gewebe ist die homozygote Nacktmaus. Diese zeichnet sich aufgrund eines autosomal-rezessiven Gendefektes durch das Fehlen funktionstüchtiger T-Zellen aus, da die Thymusanlage nur rudimentär vorhanden ist [Pantelouris 1968, Gershwil 1980, Forthmeyer 1981, Jacobsen 1981]. Das B-Zell-System ist voll entwickelt, jedoch durch das Fehlen von T-Helferzellen und T-Suppressorzellen in der Funktion eingeschränkt. Somit bestehen die Vorteile eines lebenden Systems ohne die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Die Ergebnisse können jedoch nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden [Forthmeyer 1981].

Die Proben wurden den Nacktmäusen lateral der Spina subcutan implantiert. Dies erlaubte eine regelmäßige externe Kontrolle durch Palpation und Inspektion.

Die Implantation der Hyaff® 11-Konstrukte erfolgte nach 3 Wochen in vitro-Kultur. Die Transplantate wurden nach 4 und 12 Wochen explantiert. Bis zum Ende der Kulturzeit waren alle Transplantate makroskopisch formstabil, es traten keine Infektionen auf. In der grob orientierenden makroskopischen Untersuchung zeigte sich die Konsistenz und die Druckelastizität sowie die Farbe und glänzend-durchsichtige Beschaffenheit des Gewebes ähnlich dem hyalinen Knorpel.

In der mikroskopischen Untersuchung waren die Zellen typischerweise in Lakunen liegend in der Matrix eingebettet. Diese wiesen gewisse morphologische Unterschiede zu nativen Knorpelzellen auf: Spindelförmige Zellen mit Zellausläufern waren neben der typischen rund-ovalen Zellform zu finden. Vereinzelt waren noch

Diskussion

Mitosefiguren nachweisbar. Insgesamt war das Bild deutlich inhomogener und unstrukturierter als bei nativem Knorpel. Eine Gliederung in Territorien sowie eine spezifische Binnenstruktur konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine Einsprossung von Gefäßen wurde nicht beobachtet. Auch im nativen adulten Knorpelgewebe sind keine Gefäße zu finden, das Gewebe wird ausschließlich durch Diffusion ernährt. Intaktes Knorpelgewebe besitzt das Potential, eine Tumorangio-genese zu blockieren [Brem 1975, Langer 1983]. Es wird ein eigener Angiogeneseinhibitor-Faktor ausgebildet [Moses 1990, Moses 1992]. Im Gegensatz dazu weist pathologisch veränderter Knorpel Kapillareinsprossungen auf, wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis [Weiss 1995]. Ein fehlender Nachweis von Blutgefäßen im Knorpelgewebe ist daher ein sehr wichtiger Hinweis auf den Differenzierungsgrad von Chondrozyten.

In der immunhistochemischen Untersuchung konnten alle wesentlichen Bestandteile der nativen Knorpelmatrix nachgewiesen werden (Kollagen Typ II, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Glykosaminoglykane). Allerdings konnte in manchen Arealen auch eine Persistenz von Kollagen Typ I gezeigt werden. Dieses machte etwa ein Drittel der nachweisbaren Kollagene aus. Unklar bleibt hierbei, ob es sich lediglich um Kollagen handelt, das zu Beginn der Redifferenzierungsphase noch gebildet wird und dann innerhalb der Matrix bleibend eingebettet wird. Denkbar wäre auch, daß nur ein Teil der Zellen in der Lage ist, an einem Redifferenzierungsprozeß teilzunehmen, wohingegen ein anderer Teil in dem Status der Dedifferenzierung verbleibt. Weiter besteht die Möglichkeit, daß redifferenzierte Zellen in der Lage sind, beide Kollagene gleichzeitig zu synthetisieren [Mark 1977, Homminga 1993].

Bis zum Ende des Kulturzeitraumes von maximal 12 Wochen in vivo blieben die Fasern fast unverändert bestehen. Dies entspricht nicht den Beobachtungen, die in früheren Studien mit Hyaff[®] 11 ohne Zellbesiedelung in der Ratte gemacht wurden [Benedetti 1993, Campoccia 1998]. Hier wurden die Vliesfasern innerhalb des gleichen Zeitraumes (12 Wochen in vivo) vollständig abgebaut. Ein möglicher Grund

hierfür ist, daß aufgrund der neuentstandenen Matrix ein Abbau der Makromoleküle nicht ausreichend erfolgen kann [Hutmacher 2000].

4.3 Eignung von Hyaff[®] 11 für das Tissue-Engineering von Knorpelgewebe

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Eignung des Hyaluronsäurederivats Hyaff[®] 11 als dreidimensionalen Zellträger für das Tissue-Engineering von humanem Knorpelgewebe. Entscheidende Kriterien zur Beurteilung des Materials sind die Biokompatibilität, die Bioresorbierbarkeit und die Stabilität. Die histologisch-morphologische Beurteilung des entstandenen Gewebes umfaßte die Untersuchung der Zelladhäsion, der Proliferation und der Differenzierung der Zellen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich zur Beurteilung nach Hutmacher [2000] folgende Schlüsse ziehen:

- Hyaff[®] 11 ist als Vlies eine dreidimensionale Struktur mit einer großen inneren Oberfläche. Die Voraussetzungen für ein Zellwachstum und den Transport von Stoffwechselprodukten sind erfüllt.
- Die gute Biokompatibilität von Hyaff[®] 11, die in verschiedenen Arbeiten bereits beschrieben ist (siehe unten), konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. In der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zeigte sich *in vitro* und *in vivo* eine optimale Zellverteilung im Vlies, die Chondrozyten adhärten ohne Zusätze an den Fasern, die Vitalität *in vitro* lag über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg bei 92-98 %.
- Die Biodegradation ging langsamer vonstatten als anhand der Literatur zu erwarten war. In dem Beobachtungszeitraum von max. 6 Wochen *in vitro* und 12 Wochen *in vivo* ist lediglich eine geringgradige Degradation der Fasern aufgetreten. Dies entspricht nicht den Beobachtungen, die in früheren Studien

Diskussion

mit Hyaff[®] 11 ohne Zellbesiedelung in der Ratte gemacht wurden [Benedetti 1993, Campoccia 1998]. Hier wurden die Vliesfasern innerhalb des gleichen Zeitraumes in vivo vollständig abgebaut. Eine mögliche Ursache für diese Differenz könnte sein, daß die Fasern aufgrund der einsetzenden Matrixproduktion den Degradationsmechanismen nicht mehr frei zugänglich sind.

- Die chemische Zusammensetzung von Hyaff[®] 11 ist äußerst günstig und daher ein erstrebenswertes Biomaterial. Dies äußert sich in der erwiesenen guten Biokompatibilität, dem positiven Einfluß auf den Zellstoffwechsel, dem Erhalt der Matrixbestandteile innerhalb des Zellverbandes sowie der Tatsache, daß Hyaluronsäure bereits einen natürlichen Bestandteil des nativen Knorpels darstellt. Die durch Hydrolyse von Hyaff[®] 11 entstehenden Abbauprodukte sind Hyaluronsäure und Benzyl. Beide können problemlos in der Leber abgebaut werden.
- Die mechanischen Eigenschaften von Hyaff[®] 11 lassen stark zu wünschen übrig. Vliesstrukturen sind grundsätzlich nur wenig mechanisch stabil [Hutmacher 2000]. Für eine chirurgische Handhabung ist das Material zu weich und filigran. In vitro werden die Fasern durch Hydrierung sehr fragil. Erst in vivo entsteht ein Gewebe, das stabiler ist. Nach der subcutanen Implantation in der Nacktmaus war das entstandene Transplantat ähnlich hyalinem Knorpel.

Die grundsätzlichen Anforderungen, die an ein Biomaterial für das Tissue-Engineering gestellt werden, werden somit von Hyaff[®] 11 weitgehend erfüllt.

Die ungenügenden mechanischen Eigenschaften der Vliesstruktur für eine chirurgische Handhabung können durch eine subcutane Implantation vor der endgültigen Implantation an der gewünschten Stelle umgangen werden. Möglicherweise sind andere Formen von Hyaff[®] 11, wie z.B. die Schwammstruktur, günstiger bezüglich der mechanischen Eigenschaften. Weiter sollte ein Vergleich der unterschiedlichen, gängigen Materialien (z.B. Fibrinkleber, Polyglykolat-Polylactat, Agarose u.a.) mit Hyaff[®] 11 erfolgen, um die Vorteile der einzelnen Materialien in Vergleich zu ermitteln.

Diskussion

In vitro-Experimente haben Hinweise dafür geliefert, daß Hyaluronsäure die Differenzierung von Chondrozyten positiv beeinflusst [Cortivo 1991, Fukuda 1996]. Eine weitere Serie von Experimenten hat gezeigt, daß der Einfluß von Hyaluronsäure auf diesen Differenzierungsprozeß von der verwendeten Molekülgröße abhängen könnte [Kuiawa 1986]. Der Impuls zur Redifferenzierung in vitro war jedoch nicht ausreichend, um eine Bildung von funktionstüchtigem Knorpel zu ermöglichen, die äußerte sich neben der Weiterproduktion vom Kollagen Typ I in dem ausschließliche Auftreten der Matrixbestandteile intrazellulär, wohingegen der Extrazellularraum nicht organisiert aufgebaut werden konnte.

Die gute Biokompatibilität dieses degradierbaren Biomaterials in vivo wurde in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen [Cortivo 1991, Benedetti 1993]. Im Modell der Ratte war der Einsatz von Hyaluronsäurederivaten sehr gut verträglich. Es gab in der histologischen Untersuchung keinerlei Hinweise auf eine immunologische Abstoßungs- oder Entzündungsreaktion [Campoccia 1993]. Im Kaninchenmodell konnte bereits der Uretralersatz durchgeführt werden [Italiano 1997]. Seit einigen Jahren ist Hyaff[®] 11 daher zur klinischen Anwendung zugelassen. So zum Beispiel wird das Material unter dem Handelsnamen Laserskin[®] oder Vivoderm[®] [Andreassi 1991, Donati 1995] als Hautersatz verwendet.

Hyaff[®] 11 zeigte keinerlei unerwünschte Reaktionen mit der Umgebung: Es entstand weder eine vermehrte Bildung von Bindegewebe um die Transplantate im Sinne einer Kapselfibrose noch traten Entzündungsreaktionen oder Einsprossungen von störenden Blutgefäßen auf. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß evtl. ein Teil der Zellen nicht in der Lage sind, an einer Redifferenzierung teilzunehmen. Dies äußert sich in einem Weiterbestehen der Kollagen Typ I-Produktion, den Unterschieden in der Zellmorphologie sowie einer zumindest zunächst fortbestehenden Proliferationsaktivität nach Aufbau eines dreidimensionalen Zellverbandes. In diesem Zusammenhang muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß auch im nativen Knorpelgewebe eine geringgradige Proliferation der Chondrozyten auftritt [Leonhardt 1990]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten Mitosefiguren im nati-

Diskussion

ven Septumknorpel dargestellt werden. Diese waren in der Zahl geringer als beim gezüchteten Knorpelgewebe.

Offen bleibt die Frage, in wie weit der Prozeß der Dedifferenzierung, der mit einer Änderung der Morphologie, der Proliferationsaktivität und des spezifischen Phänotypes einhergeht, reversibel ist. Ein bisher unbeantwortete Frage lautet, ob ein auf diese Weise gezüchtetes Transplantat in der Zukunft formstabil ist. Denkbar ist, daß aufgrund der fortbestehenden Proliferation ein weiteres Wachstum auftritt. Weiter ist nicht völlig ausgeschlossen, daß es sich um tatsächlich dedifferenzierte Zellen im Sinne eines malignen Prozesses handeln könnte. Hier sind weitere Untersuchungen unerlässlich. Ein Vergleich von gezüchteten adulten Chondrozyten und beispielsweise Chondrosarkomzellen könnte darüber Aufschluß geben.

Derzeit fokussieren daher viele Studien darauf, eine Dedifferenzierung der Chondrozyten möglichst zu verhindern [Freed 1997, Grande 1997, Vunjak-Novakovic 1998, Brun 1999, Quinn 1999a, Rodriguez 1999, Solchaga 1999]. Dies wird beispielsweise durch Verwendung von Bioreaktoren zur Vermehrung versucht, da sie hier ohne Adhäsion frei im Medium gehalten werden. Es gibt Hinweise darauf, daß durch Umgehen der Zelladhäsion auf einem zweidimensionalen Untergrund die Dedifferenzierung der Chondrozyten zumindest verlangsamt, wenn nicht sogar verhindert wird [Hirak 1999, Obradovic 1999, Osch 1999, Wu 1999, Yaylaoglu 1999]. Es gibt auch Ansätze, dedifferenzierte Zellen im dreidimensionalen Zellträger in einem Bioreaktor zu kultivieren [Dunkelmann 1995, Puelacher 1996, Grande 1997, Freed 1998, Martin 1998]. Bei einer Kulturzeit von 7 Monaten in vitro in einem Bioreaktor konnte so Knorpelgewebe gezüchtet werden, das 40% der mechanischen Qualitäten von nativem Knorpelgewebe erreichte [Ma 1999]. Andere Versuche zielen darauf hin, durch Ausbildung der natürlichen Druckverhältnisse in vitro eine Steigerung der Matrixproduktion zu erreichen [Li 1999, Quinn 1999b].

Weitere Möglichkeiten bestehen darin, mit Hilfe der gezielten Differenzierung von Chondrozyten aus Stammzellen ein funktionstüchtiges Gewebe zu erzeugen [Im

Diskussion

2001]. Bisher ist dies noch nicht möglich. Nach einer anfänglichen Bildung von Knorpelgewebe scheint eine Ossifikation in erheblichem Ausmaß einzutreten [Bruder 1998, Wakitani 1994]. Dies geht mit einem Funktionsverlust des Gewebes einher.

Auch der Nutzen von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für das Tissue-Engineering von Knorpelgewebe unabhängig von den verwendeten Zellen wird mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen untersucht [Klein-Nulend 1998, Osch 2000, Ponticello 2000].

In den letzten Jahren gab es verschiedene Versuche, die Methode für einen klinischen Einsatz zu etablieren. So wurde zum Beispiel gezüchteter Knorpel zur Penis-Rekonstruktion [Yoo 1999], für den Ersatz einer Ohrmuschel [Cao 1997] oder kleiner Gelenke [Sims 1998, Britt 1998, Isogai 1999, Sittinger 1999] eingesetzt. Bislang war keiner dieser Versuche über einen längeren Zeitraum erfolgreich.

5 Zusammenfassung und kritische Beurteilung

Zusammenfassend lassen sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse folgende Schlüsse ziehen:

- Humane Chondrozyten sind nach einer Dedifferenzierungs-Phase von 35 Tagen in der Monolayerkultur grundsätzlich in der Lage, ihre phänotypischen Eigenschaften im dreidimensionalen Zellverband wieder zu erlangen.
- Die Exprimierung von Matrixbestandteilen reicht *in vitro* nicht aus, um eine funktionstüchtige Matrix aufzubauen.
- Nach Transplantation in einen Organismus wird eine Matrix synthetisiert, die stabil ist.
- Das *in vivo* entstandene Gewebe weist neben den typischen histologischen Kriterien für Knorpelgewebe Charakteristika der Dedifferenzierung auf.
- Hyaff[®]11 ist als Biomaterial für das Tissue-Engineering von Knorpelgewebe prinzipiell geeignet.

Die vorliegende Arbeit erbrachte den experimentellen Nachweis, daß Hyaff[®]11 ein geeignetes Biomaterial für das Tissue-Engineering von humanem Knorpelgewebe ist. Es wurde gezeigt, daß aus kleinen Proben nativen Knorpelgewebes eine ausreichende Zellzahl für die Herstellung eines größeren dreidimensionalen Verbandes gewonnen werden kann. Die *in vitro* gebildeten Hyaff[®]11-Chondrozyten-Transplante bilden *in vivo* ein Gewebe aus, das anhand der histologischen Kriterien weitgehend Knorpelgewebe entspricht. Offen bleiben die Fragen, ob der Prozeß der Redifferenzierung mit den vorliegenden Methoden vollständig erreicht werden kann, und ob das Biomaterial Anderen überlegen in dem Nutzen für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe ist. Weitere Studien müssen hier folgen.

6 Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. E. Kastenbauer für die freundliche Aufnahme in der HNO-Forschung und bei Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in dem Institut für Chirurgische Forschung.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer und Herrn PD Dr. med. Dr. med. habil. J. Bujia für die Überlassung des interessanten Themas und die umfassende Unterstützung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. J. Aigner, der die experimentellen Untersuchungen stets kompetent und mit unermüdlichem Engagement betreute und Herrn Dr. med. R. Staudenmaier für die kreativen wissenschaftlichen Beiträge, sowie die stets kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. A. Naumann und Frau Dr. med. N. Rotter für die gute Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Frau K. Lempart und Frau A.-M. Allmeling, die mich äußerst geduldig und kompetent in die Laborarbeiten einführten und mir bei der Anfertigung histochemischer und immunhistochemischer Anfärbungen und einer Vielzahl praktischer Probleme eine unermüdliche Unterstützung zuteil werden ließen.

Herrn Prof. Dr. med. H. Höfler und Herrn Dr. rer. nat. P. Hutzler danke ich für die Bereitstellung des Konfokalen Laser Scanning Mikroskopes in der gsf Neuherberg.

Danksagung

Mein Dank gilt weiter Herrn Prof. Dr. med. R. Putz für die Nutzung des Rasterelektronenmikroskopes der Anatomischen Anstalt.

Herrn O. Frisch und allen Mitarbeitern im Tierstall des Institutes für Chirurgische Forschung gilt mein Dank für die Versorgung der Versuchstiere.

Frau A. Pavesio und allen Mitarbeitern der Fidia Advanced Biopolymers Laboratories, Abano Terme, Italien, danke ich für die Durchführung von Tierversuchen sowie die Bereitstellung des Biomaterials Hyaff[®]11.

Die Untersuchungen waren dank der finanziellen Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (BU 755) möglich.

7 Literaturverzeichnis

1. *Aigner J, Bujia J, Hutzler P, Kastenbauer E.*: Letter to the editor: distribution and viability of cultured human chondrocytes in a three-dimensional matrix as assessed by confocal laser scan microscopy. *In Vitro Cell Dev Biol* 33:407-409, 1997
2. *Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A.*: Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mat Res* 42:172-181, 1998
3. *Aigner J, Naumann A, Staudenmaier R, Tegeler J, Rotter N, Pavesio A.*: Tissue Engineering von Knorpelgewebe mit einem nicht gewebten Biomaterial auf der Basis einer Hyaluronsäureverbindung. *In: Hefte zu Der Unfallchirurg, Zelluläre Interaktionen mit Biomaterialien, Meenen NM, Katzer A, Rueger JM (Hrsg), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 140-152, 2000*
4. *Alsalameh S, Mollenhauer J, Hain N.*: Cellular immune response toward human articular chondrocytes: T cell reactivitis against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthr Rheum* 33:1477-1486, 1990
5. *Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastelli A, Donati L, Tencini ML, Malcovati M.*: Human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl-ester of hyaluronic acid suitable for grafting. *Wounds* 3:116-126, 1991
6. *Arevalo-Silva CA, Cao Y, Vacanti M, Wenig Y, Vacanti CA, Eavey R.*: Influence of growth factors on tissue-engineered pediatric elastic cartilage. *Arch Ot* 126:1234-1238, 2000
7. *Aulthouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA.*: Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 25:659-668, 1989
8. *Aydelotte MB, Kuettner KE.*: Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Conn Tiss Res* 18:205-222, 1988a

Literaturverzeichnis

9. *Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE*: Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Conn Tiss Res* 18:223-234, 1988b
10. *Balazs EA, Miller D, Stegmann R*: Viscosurgery and the use of Na-hyaluronate in intraocular lens implementation. *Paper presented at the International Congress and First Film Festival on Intraocular Implantation. Cannes, France, 1979*
11. *Balazs EA, Denlinger JL*: Sodium hyaluronate and joint function. *J Equi Vet Sci* 5:217-223, 1985
12. *Band P*: Hyaluronan derivatives: chemistry and clinical applications. *In: The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its derivatives, Band P (Hrsg.) Portland Prass, London, 1-20, 1996*
13. *Barone LM*: Cultured autologous chondrocyte implantation for cartilage repair. *Genzyme Tissue Repair, Cambridge, USA, 1996*
14. *Benedetti L, Cortivo R, Berti T, Berti A, Pea F, Mazzo M, Moras M, Abatangelo G*: Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (HYAFF) implanted in rats. *Biomater*, 14:1154-1160, 1993
15. *Benya PD, Padilla SR, Nimni ME*: Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15:1313-1321, 1978
16. *Benya PD, Shaffer JD*: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215-224, 1982
17. *Bergsma EJ, Brujn W, Rozema FR, Bos RM, Boering D*: Late tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomater* 16:25-31, 1995
18. *Böstmann O, Hirvensalo E, Mäkinen J, Rokkanen P*: Foreign body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Jt Surg* 72:592, 1990
19. *Bossier MC, Chiochia G, Ronziere MC*: Arthrogenicity of minor cartilage collagens (types IX and XI) in mice. *Arthr Rheum* 33:1-8, 1990

Literaturverzeichnis

20. *Brem H, Folkman J*: Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J exp M* 141:427-439, 1975
21. *Britt JC, Park SS*: Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Ot* 124:671-677, 1998
22. *Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L*: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med* 331:889-895, 1994
23. *Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S*: Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16:155-162, 1998
24. *Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Guidolin D, Daga Gordini D, Cortivo R*: Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mat Res* 46:337-346, 1999
25. *Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB*: Articular cartilage: Composition, structure, response to injury and methods of facilitating repair. In: *Articular cartilage and knee joint function*, JW Ewing (Hrsg.), New York, Raven Press 15-56, 1990
26. *Bujia J, Wilmes E, Krombach F, Hammer C, Kastenbauer E*: Detection of class II antigens on human nasal cartilage. *Am J Otolaryngol* 11:339-334, 1990a
27. *Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E*: Allogene Knorpeltransplantation - Immunhistochemische Untersuchungen zur Antigenität des Perichondriums. *Z exp Chir* 23:202-204, 1990b
28. *Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Burmester GR, Alsalameh S*: Class II antigen induction in cartilage. *Rheum Dis* 51:1098-1099, 1992
29. *Bujia J, Sittinger M, Pitzke P, Wilmes E, Hammer C*: Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *J Ot Rel Spec* 55:347-351, 1993
30. *Bujia J, Alsalameh S, Sittinger M, Hammer C, Wilmes E, Burmester G*: Antigen presenting cell function of class II positive human nasal chondrocytes. *Acta Otolaryngol Scand* 114:75-79, 1994

Literaturverzeichnis

31. *Bujia J*: Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen. *Ludwig-Maximilians-Universität, München, Habilitationsschrift 1995a*
32. *Bujia J, Reitzel D, Sittinger M*: In vitro Züchtung von Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Einfluß von L(+)-Laktat und Glykolat auf kultivierte humane Chondrozyten. *Laryngo-Rhino-Otol 74:183-187, 1995b*
33. *Bujia J, Sittinger M, Minuth WW, Hammer C, Burmester G, Kastenbauer E*: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. *Acta Otolaryngol Scand 115:307-310, 1995c*
34. *Butnariu-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z*: Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow: *Clin Orthop 330:234-243, 1996*
35. *Campoccia D, Hunt JA, Doherty PJ, Zhong SP, O'Regan M, Benedetti L, Williams DF*: Human neutrophil chemokinesis and polarisation induced by hyaluronic acid derivatives. *Biomater 12:1135-1139, 1993*
36. *Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF*: Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomater 19:2101-2127, 1998*
37. *Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA*: Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg 100:297-304, 1997*
38. *Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA*: Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Pol Sci 9:475-487, 1998*
39. *Capasso O, Gionti E, Pontarelli G, Ambesi Impiombato FS, Nitsch L, Tajana G, Cancedda R*: The culture of chick embryo chondrocytes and the control of their differentiated functions in vitro. I. Characterisation of the chondrocyte-specific phenotypes. *Exp Cell Res 142:197-206, 1982*
40. *Chen Q, Johnson DM, Haudenschild DR, Goetnick PF*: Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Devel Biol 172:293-306, 1995*

Literaturverzeichnis

41. *Cohen J, Lacroix P*: Bone and cartilage formation by periosteum. *J Bone Jt Surg* 77A:717-730, 1995
42. *Cortivo R, De Galateo A, Castellani I, Abatangelo G*: Hyaluronic acid promotes chick embryo fibroblast and chondroblast expression. *Cell Biol Int Rep* 14:111-112, 1990
43. *Cortivo R, Brun P, Rastrelli A, Abatangelo G*: In vitro studies on biocompatibility of hyaluronic acid esters. *Biomater* 12:727-730, 1991
44. *Darzynkiewicz Z, Balazs EA*: Effects of connective tissue intercellular matrix on lymphocyte stimulation: I. Suppression of lymphocyte stimulation by hyaluronic acid. *Exp Cell Res* 66:113-116, 1971
45. *Desmukh K, Kline G*: Characterisation of collagen and precursors synthesized by rabbit-articular-cartilage cells in various culture systems. *Eur J Biochem* 69:117-123, 1976
46. *Donati L, Marazzi M, Veronesi AM, Ordanini MN, Falcone L, Ferrone M, Mauri S*: Treatment of cutaneous wound with cultured human keratinocytes on hyaluronic acid membrane. *J Biomed Mat Res* 27:11-23, 1993
47. *Dunkelman NS, Zimmer MP, LeBarone RG, Pavelec R, Kwan M, Purchio AF*: Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system. *Biotechn Bioeng* 46:299-305, 1995
48. *Forthmeyer HP*: Thymusaplastische Maus (nu/nu), Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu): Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. *Berlin und Hamburg: Parey Verlag*, 1981
49. *Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R*: Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mat Res* 27:11-23, 1993
50. *Freed LE, Langer R, Martin I, Pellis NR, Vunjak-Novakovic G*: Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:13885-13890, 1997
51. *Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G*: Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 240:58-65, 1998

Literaturverzeichnis

52. *Forrester JV, Balazs EA*: Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immun* 40:435-439, 1980
53. *Fortier LA, Lust G, Mohammed HO, Nixon AJ*: Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin discs cultures supplement with exogenous insuline-like growth factor. *J Orthop Res* 17:467-474, 1999
54. *Fukuda K, Dan H, Takayama M, Kumano F, Saitoh M, Tanaka S*: Hyaluronic acid increases proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1. *Pharm Exp Ther* 277:1672-1675, 1996
55. *Gershwin ME, Castles JJ, Makishima R*: Accelerated plasmacytoma formation in mice treated with alpha-fetoprotein. *J Nat Canc Inst* 64:145-149, 1980
56. *Gibson T*: Cartilage grafts. In: *Transplantation von Organen und Geweben*. Seifert KE, Geisendörfer R (Hrsg), Thieme, Stuttgart, 203-210, 1967
57. *Gibson T, Davis WB*: Some further observations on the use of p43 served bovine cartilage implants in man. *Br J Plast Surg* 8:85-92, 1955
58. *Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R*: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mat Res* 34:211-220, 1997
59. *Guilak F, Ratcliffe A, Mow van C*: Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: A confokal microscopy study. *J Bone Jt Surg* 13:410-421, 1995
60. *Hammer C, Bujia J*: Immunologie vitaler und konservierter Transplantate. *Oto Rhino Laryngol* 1:2-26, 1992
61. *Haisch A, Schutz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M*: Tissue-engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel- und Polymervliesstrukturen. *HNO* 44:614-629, 1996
62. *Hayflick L*: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-636, 1965

Literaturverzeichnis

63. Hirak Y, Mitsui K, Endo N, Takahashi K, Hayami T, Inoue H, Shukunami C, Tokunaga K, Kono T, Yamada M, Takahashi HE, Kondo J: Molecular cloning of human chondromodulin-I, a cartilage-derived growth modulating factor, and its expression in chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 260:869-878, 1999
64. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, Linden Van Der AJ: Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Jt Surg* 72B:1003-1007, 1990
65. Homminga GN, Buma P, Koot HWJ, van der Kraan PM, van den Berg WB: Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 64:441-445, 1993
66. Huttmacher DW: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomater* 21:2529-2543, 2000
67. Im GI, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH: Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Jt Surg* 83:289-294, 2001
68. Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP: Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering. *J Bone Jt Surg* 81A:306-316, 1999
69. Italiano G, Abatangelo G Jr, Calabro A, Abatangelo G Sr, Zanoni R, O'Regan M, Passerini G: Reconstructive surgery of the urethra: a pilot study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (Hyaff-11) biodegradable grafts. *Urol Res* 25:137-42, 1997
70. Itin P, Pittelkow MR: Autologe Epitheltransplantation mit kultivierten Keratinozyten. *Helv Chir Acta* 57:61-66, 1990
71. Jacobsen GK, Rygaard J, Povlsen CO: Immunological reconstruction of tumor transplanted and thymus-grafted nude mice. *Exp Cell Biol* 49: 148-153, 1981
72. Kastenbauer ER: Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Oberbereich. *HNO* 31:371-380, 1982

Literaturverzeichnis

73. *Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M*: Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol* 179:142-148, 1999
74. *Klein-Nulend J, Semeins CM, Mulder JW, Winters HA, Goei SW, Burger EH*: Stimulation of cartilage differentiation by osteogenic protein-7 in cultures of human perichondrium. *Tissue Eng* 4:305-13, 1998
75. *Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK*: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics and morphology. *J Cell Biol* 93:743-750, 1982a
76. *Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC*: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol* 93:751-757, 1982b
77. *Kuiawa MJ, Carrino DA, Caplan A*: Substratebonded hyaluronic acid exhibits a size-dependent stimulation of chondrogenic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture. *Devel Biol*, 114:519-522, 1986
78. *Langer R, Murray J*: Angiogenesis inhibitors and their delivery systems. *Appl Biochem Biotechnol* 8:9-24, 1983
79. *Larsen NE, Lombard KM, Paren EG, Balazs EA*: Effect of Hyaluronan on cartilage and chondrocyte cultures. *J Orthop Res* 10:23-32, 1992
80. *Laurent TC*: The interactions between polysaccharides and other macromolecules: The exclusion of molecules from hyaluronic acid gels and solutions. *Biochem J* 93:106-12, 1964
81. *Laurent TC, Laurent UB, Fraser JRE*: The structure and function of hyaluronan: an overview. *Immunol Cell Biol* 74:1-7, 1996
82. *Layman DL, Sokoloff L, Miller EJ*: Collagen synthesis by articular chondrocytes in monolayer culture. *Exp Cell Res* 73:107-112, 1972
83. *Leonhardt H*: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Auflage, Thieme, Stuttgart, 111-152, 1990

Literaturverzeichnis

84. *Li KW, Falcovitz YH, Nagrampa JP, Chen AC, Lottman LM, Shyy YJ, Sah RL:* Effects of compression on proliferation of transplanted chondrocytes. In: *Abstract-book, 45th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Anaheim, California, February 1-4, 1999*
85. *Lussier A, Cividino A, McFarlane C, Olszynski W, Potashner W, DeMedicis E:* Viscosupplementation with Hylan for the treatment of osteoarthritis: Findings from the clinical practice in Canada. *J Rheumatol 23:1579-1585, 1996*
86. *Ma PX, Schloo B, Mooney D, Langer R:* Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage. *J Biomed Mat Research, 29:1587-1595, 1995*
87. *Ma PX, Langer R:* Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage. *J Biomed Mat Res 44:217-21, 1999*
88. *Martin I, Padera RF, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE:* In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthop Res 16:181-9, 1998*
89. *Mark von der K, Gauss V, Mark von der H, Müller P:* Relationship between shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nat 267:531-532, 1977*
90. *Meinhart J, Fussenegger M, Hobling W:* Stabilisation of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. *Ann Plast Surg 42:673-678, 1999*
91. *Mooney DJ, Mazzoni CL, Breuer C, McNamara K, Hern D, Vacanti JP, Langer R:* Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. *Biomater 17:115-124, 1996*
92. *Moses MA, Sudhalter J, Langer R:* Identification of an inhibitor of neovascularisation from cartilage. *Sci 248:1408-1410, 1990*
93. *Moses MA, Sudhalter J, Langer R:* Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularisation from scapular chondrocytes. *J Cell Biol 119:475-482, 1992*
94. *Mow van C, Ratcliffe A, Rosenwasser MP, Buckwalter JA:* Experimental studies on repair of large osteochondral defects at a high weight bearing area of the knee joint: a tissue engineering study. *J Biomech Eng 113:198-207, 1991*

Literaturverzeichnis

95. *Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, Feerd LE*: Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineering cartilage. *Biotechn Bioeng* 63:197-205, 1999
96. *Osch van GJ, ten Koppel PG, van der Veen SW, Poppe P, Burger EH, Verwoerd-Verhoef HI*: The role of trabecular demineralized bone in combination with perichondrium in the generation of cartilage grafts. *Biomater* 20:233-240, 1999
97. *Osch van GJ, van der Veen SW, Burger EH, Verwoerd-Verhoef HI*: Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium. *Tissue Eng* 6:321-330, 2000
98. *Osch van GJ, van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HL*: In vitro redifferentiation of cultur-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 107:433-440, 2001
99. *Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA*: De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* 97:168-178, 1996
100. *Pantelouris EM*: Absence of thymus in a mouse mutant. *Nat* 217:237, 1968
101. *Park SS, Ward MJ*: Tissue-engineered cartilage for implantation and grafting. *Facial Plast Surg* 22:278-283, 1995
102. *Patrick Jr CW, Mikoa AG, McIntire LV*: Prospectus of tissue engineering. In: *Frontiers in tissue engineering. Patrick Jr CW, Mikoa AG, McIntire LV (Hrsg.), Elsevier Science, New York 3-11, 1998*
103. *Pavasant P, Shizari T, Underhill CB*: Hyaluronan contributes to enlargement of hypertrophic lacuna in the growth plate. *J Cell Sci*, 109:327-334, 1996
104. *Peretti GM, Bonassar LJ, Caruso EM, Randolph MA, Trahan CA*: Biomechanical analysis of a chondrocyte-based repair model of articular cartilage. *Tissue Eng* 5:317-26, 1999
105. *Pitzke P, Bujia J, Wilmes E, Hammer C*: Expression of ICAM-1 on isolated human nasal, auricular and costal chondrocytes. *Acta Otolaryngol* 114:81-86, 1994

Literaturverzeichnis

106. Ponticello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP: Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mat Res* 52:246-55, 2000
107. Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo CD, Vacanti CA: Femoral shaft rekonstruction using tissue engineered growth of bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25:223-228, 1996
108. Quinn TM, Maung AA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD: Physical and biological regulation of proteoglycan turnover around chondrocytes in cartilage explants. Implications for tissue degradation and repair. *Ann NY Acad Sci*, 878:420-441, 1999a
109. Quinn TM, Maung AA, Carver SE, Heath CA: Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. *Biotechn Bioeng* 62:166-174, 1999b
110. Rehm KE, Claes L, Helling HJ, Hutmacher D: Application of a polylactide pin. An open clinical prospective study. In: *Biodegradable implants in fracture fixation*. Leung KS, Hung LK, Leung PC (Hrsg.), World Scientific, Hong Kong: 54-58, 1994
111. Ritsula VA, Santavirta S, Alhopuro S: Periosteal and perichondrial grafting in reconstructive surgery. *Clin Orthop* 302:259-265, 1994
112. Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: Collagen in tissue engineering cartilage: types, structure and crosslinks. *J Cell Biochem* 71:313-327, 1998
113. Robinson D, Halperin N, Nevo Z: Regenerating hyaline cartilage in articular defects of old chickens using implants of embryonal chick chondrocytes embedded in a natural delivery substance. *Calcif Tissue Int* 46:246-253, 1990
114. Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA: Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 103:1111-1119, 1999
115. Rotter N: Untersuchungen zum in vivo Verhalten von in vitro gezüchtetem vitalen Knorpeltransplantatmaterial. Ludwig-Maximilians-Universität, München, *Dissertationsarbeit*, 1996

Literaturverzeichnis

116. *Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M*: Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mat Res* 42:347-356, 1998
117. *Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M, Mulder G, Parenteau NL*: Cultured skin as a smart material for healing wounds: Experience in venous ulcers. *Biomater* 17:311-320, 1996
118. *Scale D, Wobig M, Wolpert W*: Viscosupplementeion of osteoarthritic knees with Hylan: a treatment schedule study. *Curr Ther Res* 55:230-43, 1994
119. *Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ*: Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 103:1809-1818, 1999
120. *Sims CD, Butler PE, Casanova R, Lee BT, Randolph MA, Lee WP, Vacanti CA, Yaremchuk MJ*: Injectable cartilage using polyethylene oxide polymer substrates. *Plast Reconstr Surg* 98:843-850, 1996
121. *Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ*: Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 101:1580-1585, 1998
122. *Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR*: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomater* 15:451-456, 1994
123. *Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupt T, Burmester GR*: Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 58:130-135, 1999
124. *Skalak RC, Fox CF*: Tissue Engineering. 1. Auflage, Alan R Liss Inc, New York, 1988
125. *Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan A*: Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and Cartilage. *J Orthop Res* 17:205-213, 1999
126. *Solursh M*: Formation of cartilage tissue in vitro. *J Cell Biochem* 45:258-260, 1991

Literaturverzeichnis

127. *Susante van JLC, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, Homminga GN*: Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 66:549-556, 1995
128. *Susante van JL, Buma P, van Beuningen HM, van den Berg WB*: Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. *J Orthop Res* 18:68-77, 2000
129. *Stading M, Langer R*: Mechanical shear properties of cell-polymer cartilage constructs. *Tissue Eng* 5:241-50, 1999
130. *Starke G*: Possible virus contaminants in tissue banking. *J Orthop Trauma* 37:492-495, 1990
131. *Takahashi M, Kawa-uchi T, Wakabayashi Y, Ae K, Shinomiya K*: Hyaluronic acid induces osteoblastic differentiation of osteoblast progenitor cells. In: *Abstract-book des 45th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Anaheim, California, February 1-4, 1999*
132. *Tange RA, Troost D, Limburg M*: Progressive fatal dementia (Creutzfeldt-Jakob disease) in a patient who received homograft for tympanic membrane closure. *Eur Arch Ot* 247:199-201, 1990
133. *Toole BP, Munaim SI, Wells S, Knudson CB*: Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation and hyaluronate synthesis during limb development. *Ciba Found Symp*, 143:138-145, 1989
134. *Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE*: Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog* 14:193-202, 1998
135. *Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H*: Repair of articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Jt Surg* 71B:74-80, 1989
136. *Wakitani S, Goto T, Pineda SJ*: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg* 76A:579-592, 1994
137. *Weiser L, Bhargava M, Attia E, Torzilli PA*: Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels. *Tissue Eng* 5:533-44, 1999

Literaturverzeichnis

138. Weiss C, Band P: Musculoskeletal applications of hyaluronan and hylan. *Clin Podiatric Med Surg* 12:497-517, 1995
139. West DC, Wennar S: The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 183:179-196, 1989
140. Westhues M, Federspil P: Die antigene Wirkung des Knorpels: 3. Knorpelzellen und Grundsubstanz und ihre antigene Wirkung. *Laryng Rhinol Otol* 49:815-817, 1970
141. Wu F, Dunkelmann N, Peterson A, Davisson T, De La Torre R, Jain D: Bioreactor development for tissue-engineered cartilage. *Ann NY Acad Sci* 875:405-411, 1999
142. Yablon IG, Cooperband S, Covall D: Matrix antigens in allografts. The humoral response. *Clin Orthop* 168:243-251, 1982
143. Jaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R, McPherson JM: Synergistic action of transforming growth factor- β and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 237:318-325, 1997
144. Yaylaoglu MB, Yildiz C, Korkusuz F, Hasirci V: A novel osteochondral implant. *Biomater* 20:1513-1520, 1999
145. Yoo JJ, Park HJ, Lee I, Atala A: Autologous engineered cartilage rods for penile reconstruction. *J Urol* 162:1119-1121, 1999
146. Zacchi V, Soranzo C, Cortivo R, Radice M, Brun P, Abatangelo G: In vitro engineering of human skin-like tissue. *J Biomed Mat Res* 40:187-194, 1998
147. Zilla P, Fasol R, Preiss P, Kadletz M, Deutsch M, Schima H, Tsangaris S, Groscurth P: Use of fibrin glue as substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surg* 105:515-522, 1989

Die Abkürzungen der Zeitschriften erfolgten gemäß:

- Leistner O. (Hrsg.): ITA/Internationale Titelabkürzungen. Bd. 1-3, 8. Auflage, Felix Dietrich Verlag Osnabrück, 2000
- Alkire L.G. (edit.): Periodical title abbreviations: by abbreviation and by title. 13th edition, Gale group, Detroit, 2001

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Julia Anne Tegeler
Geboren am 21. Mai 1973
in München

Schulausbildung:

Grundschule an der Raiffeisenstraße, Unterschleißheim	1979-1983
Carl-Orff-Gymnasium, Unterschleißheim	1983-1992

Universitätsausbildung:

Studium der Humanmedizin

Immatrikulation	Wintersemester 1992/93 an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Physikum	23.3.1995
Immatrikulation	Sommersemester 1995 an der Technischen Universität München
1. Staatsexamen	21.3.1996
2. Staatsexamen	25.3.1998
3. Staatsexamen	10.11.1999

Berufsausbildung:

Ärztin im Praktikum	Vom 1.12.1999 bis 7.6.2001 bei Prof. Dr. med. W. Mühlbauer Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Handchirurgie, Zentrum für Schwer- brandverletzte Krankenhaus München Bogenhausen
---------------------	--

München, im Juli 2001