

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Hals- Nasen- Ohren Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
Direktor Univ.- Prof. Dr. H. A. Bier

ANZÜCHTUNG VON CHONDROZYTEN IN EINER
3D- KULTUR AUF DEM TRÄGERMATERIAL
NOVOCART®

Magdalena Luise Charlotte Lenschow

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier
2. Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff

Die Dissertation wurde am 03.06.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2015 angenommen.

Meiner Familie gewidmet

ABSTRACT

Die Deckung und Rekonstruktion von Knorpeldefekten stellen nach wie vor eine Herausforderung für die moderne Medizin dar. Durch die geringe Selbstheilungstendenz des hyalinen Knorpels und die oftmals, gerade in der Kopf-Hals- Chirurgie, unschönen ästhetischen Folgen ist eine suffiziente Therapie von Knorpeldefekten notwendig. Bisherige Verfahren, wie die autologe oder allogene Transplantation von Knorpelgewebe stoßen durch Mangel an Spendergewebe, mehrzeitige operative Eingriffe, Infektions- oder Abstoßungsrisiken an ihre Grenzen.

Die Kultivierung und Expansion autologer Chondrozyten durch Tissue Engineering stellt hierbei eine vielversprechende Alternative dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzüchtung humaner Chondrozyten auf der neuartigen Trägermatrix Novocart® 3D und die Eignung des Materials in Hinblick auf die Deckung von Gewebsdefekten in der rekonstruktiven Kopf-Hals- Chirurgie untersucht.

Hierfür wurde humaner Septumknorpel verwendet, der insgesamt 23 Patienten im Rahmen einer Septum- oder Septorhinoplastik operativ entnommen wurde. Die Chondrozyten wurden mittels enzymatischen Verdaus aus ihrem Knorpelkonstrukt gelöst, in Monolayerkultur wiederholt expandiert und anschließend auf dem Träger angesiedelt. Nach Einbringen in den dreidimensionalen Gewebsverband konnte eine Redifferenzierung einiger Zellen zu einer chondrozytenartigen Morphologie beobachtet werden.

Über mehrere, aufeinander aufbauende Versuchsreihen wurden schrittweise die Kulturbedingungen optimiert und durch die neuen Erkenntnisse aus den Vorversuchen erweitert. So wurde das Verhalten der expandierten Zellen auf der Trägermatrix untersucht und die mit unterschiedlichen Zellzahlen beimpften Matrices über verschiedene Zeiträume miteinander verglichen.

Ebenso wurden mögliche Beimpfungsstrategien analysiert und an der Optimierung des Kulturmediums gearbeitet.

Zusammenfassend zeigte sich, dass optimale Kulturbedingungen einerseits durch die Verwendung knorpelspezifischer Nährmedien oder wachstumsfördernde Zusätze wie beispielsweise Insulin und andererseits durch Wählen der geeigneten Kulturpassage geschaffen werden.

Die Verwendung von Novocart® 3D als strukturgebende Trägermatrix für Tissue Engineering mit Chondrozyten ist ein interessanter Forschungsansatz. Die Besiedelung mit Chondrozyten sollte in weiteren Studien optimiert und an die speziellen Anforderungen des Trägermaterials angepasst werden.

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Knorpelgewebe, -bedarf und -ersatz	2
1.2 Tissue Engineering zum Knorpelersatz	5
1.2.1 Zellmaterial	6
1.2.2 Trägermaterial	8
1.2.3 Kulturbedingungen	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	10
II MATERIAL UND METHODEN	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Patientendaten und -material	12
2.2 Trägermaterial	12
2.3 Zellkulturtechniken	14
2.3.1 Gewebeverdau	14
2.3.2 Bestimmung der Zellzahl	15
2.3.3 Monolayer-Kultur	15
2.4 Besiedelung der Trägermatrix Novocart®3D	16
2.5 Aufbau der Versuchsreihen	17
2.5.1 Versuchsreihe 1	17
2.5.2 Versuchsreihe 2	18
2.5.3 Versuchsreihe 3	18
2.5.4 Versuchsreihe 4	18
2.5.5 Versuchsreihe 5	18
2.5.6 Versuchsreihe 6	19
2.5.7 Versuchsreihe 7	20
2.6 Präparationsmethoden	20
2.6.1 Aufbereitung für die Histologie	20
2.6.2 Färbemethoden	20
2.7 Biochemische Verfahren	23

2.7.1	Papainverdau	23
2.7.2	Quantifizierung des Glykosaminoglykan/e (GAG)- Gehalts mittels DMMB - Assay	23
2.7.3	Bestimmung des Desoxyribonucleinacid (DNA) - Gehalts mittels Hoechst - Assay	24
2.7.4	Statistische Auswertung der biochemischen Assays	25
III	ERGEBNISSE	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Knorpelisolierung	27
3.2	Monolayerkultur	27
3.3	3D - Kultur	27
3.4	Ergebnisse der Versuchsreihen	28
3.4.1	Versuchsreihe 1	28
3.4.2	Versuchsreihe 2	32
3.4.3	Versuchsreihe 3	48
3.4.4	Versuchsreihe 4	53
3.4.5	Versuchsreihe 5	59
3.4.6	Versuchsreihe 6	59
3.4.7	Versuchsreihe 7	67
IV	DISKUSSION	70
4	DISKUSSION	71
V	ANHANG	77
A	ANHANG	78
A.1	Messwerttabellen der biochemischen Assays	78
A.1.1	DNA- Assay nach Hoechst	78
A.1.2	DMMB- Assay	80
VI	DANKSAGUNG	82
B	DANKSAGUNG	83
	LITERATURVERZEICHNIS	84

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1	Novocart ®3D, Leeraufnahme, Hämatoxylin - Eosin (HE) . . .	13
Abbildung 2.2	Novocart ®3D, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	14
Abbildung 3.1	Versuchsreihe 1, Vorbehandlung des Trägers mit Ethanol, Färbung: AB	29
Abbildung 3.2	Versuchsreihe 1, Vorbehandlung mit Ethanol, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: Alcianblau- Kernechtrot (AB) . . .	29
Abbildung 3.3	Versuchsreihe 1, Einbringen der Chondrozyten mittels Kanüle in das Konstrukt, Färbung: AB	30
Abbildung 3.4	Versuchsreihe 1, Beimpfung mittels Kanüle, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	30
Abbildung 3.5	Versuchsreihe 1, Beimpfung des Konstrukt mittels Kapillar- wirkung, Färbung: AB	31
Abbildung 3.6	Versuchsreihe 1, Beimpfung mittels Kapillarwirkung, ver- größerter Bildausschnitt, Färbung: AB	31
Abbildung 3.7	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen. Die Zellen durchdringen den Träger homogen, Ballungszentren finden sich vor allem an Rand- bereichen. Färbung: AB	33
Abbildung 3.8	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	33
Abbildung 3.9	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen, Färbung: Safranin - O (SO)	34
Abbildung 3.10	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO . . .	34
Abbildung 3.11	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen, Färbung: SO	35
Abbildung 3.12	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO .	35

Abbildung 3.13	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen, Färbung: SO	36
Abbildung 3.14	Versuchsreihe 2, drei Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO .	36
Abbildung 3.15	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen, Färbung: AB	37
Abbildung 3.16	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	38
Abbildung 3.17	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen, Färbung: SO	38
Abbildung 3.18	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO . .	39
Abbildung 3.19	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen, Färbung: AB	39
Abbildung 3.20	Versuchsreihe 4, fünf Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB .	40
Abbildung 3.21	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen, Färbung: SO	40
Abbildung 3.22	Versuchsreihe 2, fünf Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO .	41
Abbildung 3.23	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen, Färbung: SO	42
Abbildung 3.24	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO	42
Abbildung 3.25	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen, Färbung: AB	43
Abbildung 3.26	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB . .	43
Abbildung 3.27	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen, Färbung: SO	44
Abbildung 3.28	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO .	44

Abbildung 3.29	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen, Färbung: AB	45
Abbildung 3.30	Versuchsreihe 2, sieben Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	45
Abbildung 3.31	Versuchsreihe 2, Vergleich der zeitabhängigen Veränderung des DNA- Gehalts nach Beimpfung mit unterschiedlichen Zellzahlen	47
Abbildung 3.32	versuchsreihe 2, Vergleich der zeitabhängigen Veränderung des Glykosaminoglykangehalts- Gehalts nach Beimpfung mit unterschiedlichen Zellzahlen	47
Abbildung 3.33	Versuchsreihe 3, Anzüchtung von einer Million Zellen, HE	48
Abbildung 3.34	Versuchsreihe 3, Anzüchtung von einer Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, HE	49
Abbildung 3.35	Versuchsreihe 3, Anzüchtung von zwei Million Zellen, HE	50
Abbildung 3.36	Versuchsreihe 3, Anzüchtung von zwei Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, HE	50
Abbildung 3.37	Versuchsreihe 3, Anzüchtung von drei Million Zellen, SO	51
Abbildung 3.38	Versuchsreihe 3, Anzüchtung von drei Million Zellen, vergrößerter Bildausschnitt, SO	52
Abbildung 3.39	Versuchsreihe 4, drei Wochen nach Beimpfung,SO	54
Abbildung 3.40	Versuchsreihe 4, drei Wochen nach Beimpfung, vergrößerter Bildausschnitt, SO	54
Abbildung 3.41	Versuchsreihe 4, fünf Wochen nach Beimpfung,HE	55
Abbildung 3.42	Versuchsreihe 4, fünf Wochen nach Beimpfung, vergrößerter Bildausschnitt, HE	55
Abbildung 3.43	Versuchsreihe 4, sieben Wochen nach Beimpfung,SO	56
Abbildung 3.44	Versuchsreihe 4, sieben Wochen nach Beimpfung, vergrößerter Bildausschnitt, SO	56
Abbildung 3.45	Versuchsreihe 4, Vergleich der zeitabhängigen Veränderung des DNA - Gehalts	57
Abbildung 3.46	Versuchsreihe 4, Vergleich der zeitabhängigen Veränderung des Glykosaminoglykan - Gehalts	58
Abbildung 3.47	Versuchsreihe 6, zwei Tage nach Beimpfung, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + Insulin, Färbung: AB	60

Abbildung 3.48	Versuchsreihe 6, zwei Tage nach Beimpfung, DMEM + Insulin, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	60
Abbildung 3.49	Versuchsreihe 6, zwei Tage nach Beimpfung, DMEM + Insulin, Färbung: SO	61
Abbildung 3.50	Versuchsreihe 6, zwei Tage nach Beimpfung, DMEM + Insulin, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO	61
Abbildung 3.51	Versuchsreihe 6, fünf Tage nach Beimpfung, DMEM + Insulin, Färbung: SO	62
Abbildung 3.52	Versuchsreihe 6, fünf Tage nach Beimpfung, DMEM + Insulin, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO	63
Abbildung 3.53	Versuchsreihe 6, zwei Tage nach Beimpfung, Chondrocyte Growth Medium (CGM), Färbung: SO	64
Abbildung 3.54	Versuchsreihe 6, zwei Tage nach Beimpfung, CGM , vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO	64
Abbildung 3.55	Versuchsreihe 6, fünf Tage nach Beimpfung, CGM , Färbung: AB	65
Abbildung 3.56	Versuchsreihe 6, fünf Tage nach Beimpfung, CGM , vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	65
Abbildung 3.57	Versuchsreihe 6, zeitabhängige Veränderung des DNA -Gehalts in unterschiedlichen Nährmedien	66
Abbildung 3.58	Versuchsreihe 6, zeitabhängige Veränderung des GAG -Gehalts in unterschiedlichen Nährmedien	67
Abbildung 3.59	Versuchsreihe 7, direkte Zellansiedelung auf Objektträgern, Färbung: AB	68
Abbildung 3.60	Versuchsreihe 7, direkte Zellansiedelung auf Objektträgern, vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: AB	68
Abbildung 3.61	Versuchsreihe 7, direkte Zellansiedelung auf Objektträgern, Färbung: SO	69

Abbildung 3.62 Versuchsreihe 7, direkte Zellansiedelung auf Objektträgern,
vergrößerter Bildausschnitt, Färbung: SO 69

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1	Pipettierschema Hoechst - Assay	25
Tabelle A.1	Messwerte des Hoechst -Assays der Versuchsreihe 2	78
Tabelle A.2	Messwerte des Hoechst -Assays der Versuchsreihe 4	79
Tabelle A.3	Messwerte des Hoechst -Assays der Versuchsreihe 6	79
Tabelle A.4	Messwerte des DMMB -Assays der Versuchsreihe 2	80
Tabelle A.5	Messwerte des DMMB -Assays der Versuchsreihe 4	80
Tabelle A.6	Messwerte des DMMB -Assays der Versuchsreihe 6	81

LISTINGS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Antibiotic, Antimycotic
AB	Alcianblau- Kernechtrot
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
BMP	Bone Morphogenic Protein
CGM	Chondrocyte Growth Medium

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonucleinacid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
rpm	Round per Minute
GAG	Glykosaminoglykan/e
HE	Hämatoxylin - Eosin
IGF-I	Insulin Like Growth Factor-I
IL	Interleukin
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + TWEEN
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Polylaktide
POC	Poly(1,8 octanediol citrate)
SO	Safranin - O
rpm	revolutions per minute
TE	Tissue Engineering
TGF	Transforming Growth Factor

Teil I

EINLEITUNG

EINLEITUNG

1.1 KNORPELGEWEBE, -BEDARF UND -ERSATZ

Knorpelgewebe ist ein Stützgewebe mit vielfältigen Aufgaben und Eigenschaften. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Matrix kann es sich an verschiedene Anforderungen anpassen. So zeichnet sich Knorpel nicht nur durch eine hohe Reiss- und Druckelastizität, sondern auch durch biegestabile Verformbarkeit aus. Die Zusammensetzung und der jeweilige Faseranteil der Interzellulärsubstanz bestimmt die Einteilung des Knorpelgewebes in hyalinen Knorpel, elastischen Knorpel und Faserknorpel. Da sich diese Arbeit mit hyalinem Knorpel beschäftigt, soll im Folgenden auch nur auf diese Knorpelart eingegangen werden.

Der hyaline Knorpel entwickelt sich aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks. Wird er während seiner Entwicklung noch über Blutgefäße versorgt, ist der ausdifferenzierte hyaline Knorpel ein gefäß- und nervenfreies Gewebe. Der zelluläre Anteil wird von den Chondrozyten gebildet, die nur etwa 1-10 % des gesamten Knorpelvolumens ausmachen. Sie liegen eingebettet in die extrazelluläre Matrix und sind zuständig für belastungsangepasste Synthese und Abbau der Bestandteile der Extrazellulären Matrix (EZM). Der Knorpelstoffwechsel erfolgt aufgrund der Nährstoffversorgung über Diffusion und der fehlenden Gefäßanbindung anaerob. Die Nährstoffversorgung der Chondrozyten geschieht über subchondral gelegene Knochenkapillaren oder die Synovialflüssigkeit [60].

Kollagene und Proteoglykane bilden zusammen mit Wasser und Ionen die Hauptkomponenten der extrazellulären Knorpelmatrix [50]. Die einzelnen Kollagenfibrillen lagern sich zu einem Netz zusammen und ermöglichen die hohe Zugfestigkeit und Biegeelastizität des Knorpelgewebes. Vor allem Kollagenfibrillen vom Kollagentyp II halten hohen Zugbelastungen stand und bestreiten mit ca. 90-95 % den Hauptanteil an den Kollagenfibrillen des Knorpels [60]. Das restliche Kolla-

gen wird von den Typen VI, IX, X und XI gebildet und dient unter anderem zum Schutz der Chondrozyten vor zu starker Kompression (Typ VI), zur Einbettung der Proteoglykane (Typ XI), zur Stabilisierung des Kollagengerüsts (Typ IX und XI) und zur Verbindung zwischen Chondrozyt und [EZM](#) .

Kollagen vom Typ I kommt zwar nur in Faserknorpel vor, spielt aber eine wichtige Rolle bei der Heilung von Knorpelschäden. So wird in der Regenerationsphase nach Knorpelverletzungen vorwiegend Faserknorpel gebildet, der jedoch nicht die gleiche Belastbarkeit wie hyaliner Knorpel aufweist [23].

Die von den Chondrozyten produzierten Proteoglykane enthalten sulfatierte Polysaccharideinheiten, die [GAG](#). Diese zeichnen sich durch eine hohe Wasserbindung aus und ermöglichen damit die Viskoelastizität und Druckfestigkeit des Knorpels. Charakteristisch für den hyalinen Knorpel ist das Proteoglykan Aggrekan, welches die [GAG](#)- Ketten Chondroitin- und Keratansulfat besitzt. Durch deren ausgeprägte Hydrophilie sind sie maßgeblich beteiligt an der Schaffung der elastischen Fähigkeiten des Knorpels. Zusammen mit Hyaluronsäure bildet das Aggrekan Molekülkomplexe, die den Großteil des Knorpels ausmachen und ihm die gelartige Konsistenz, sowie die Formstabilität verleihen [71]. Diese Bindung zwischen Hyaluronsäure und Aggrekan kann durch einen niedrigen pH oder vermehrte Scherkräfte gestört werden [60].

Der Ersatz und die funktionelle Wiederherstellung untergegangenen Gewebes stellt nach wie vor eine große Herausforderung der heutigen Medizin dar. Oft können Gewebsschäden, hervorgerufen durch Traumata, Entzündungen, neoplastische oder degenerative Prozesse, nur unzureichend therapiert werden.

Die Rekonstruktion von Knorpelschäden stellt hier eine besondere Hürde dar. Durch die geringe Regenerationsfähigkeit und die schlechte Blutversorgung des Knorpelgewebes [38, 35] ist die Selbstheilung stark eingeschränkt und führt zu morphologischen und funktionellen Einbußen. Hyaliner Knorpel wird hierbei oft durch funktionell minderwertigeren Faserknorpel ersetzt [14], der das ursprüngliche Gewebe nur unzureichend ersetzen kann.

Vor allem im Kopf-Hals-Bereich sind Knorpeldefekte ästhetisch wie auch funktionell beeinträchtigend. Mikrotie, Dysplasien der Ohrmuschel oder Formveränderungen des knorpeligen Nasenskelettes sind einige Beispiele für den hohen Bedarf an Knorpelgewebe zur rekonstruktiven Defektdeckung.

Eine der führenden Therapiemöglichkeiten in der Kopf- und Halschirurgie zum Knorpelersatz ist die Autologe Chondrozytentransplantation (ACT), erstmals 1968 durchgeführt von Smith and Chesterman [15].

Hierbei wird dem Patienten in einer ersten Operation eine Knorpelbiopsie entnommen und daraus in vitro eine Suspension aus kultivierten Chondrozyten angefertigt. Die Chondrozytensuspension wird auf einen Carrier aufgebracht und in einer zweiten Operation dem Patienten implantiert. Mehrfache Modifikationen der klassischen autologen Chondrozytentransplantation führten zur Etablierung verschiedener Generationen der ACT:

Die klassische Form wurde zuerst von Brittberg et al. als die erste Generation der Zelltransplantation zur Versorgung von Knorpelschäden beschrieben. Die kultivierten Chondrozyten wurden hier unter einem Periostlappen eingebracht [7].

In der zweiten Generation wurden statt des Periostlappens Kollagenmembranen über die angesiedelten Chondrozyten gelegt.

In der dritten Generation der ACT wurden schließlich Biomaterialien, die mit den kultivierten Chondrozyten beimpft wurden, als Carrier auf die Knorpeldefekte übertragen [43].

Dank der günstigen immunologischen Verhältnisse, des geringen Infektionsrisikos und der guten klinischen Ergebnisse [2, 26] ist die ACT eine gängige Methode zum Knorpelersatz. Es gibt allerdings auch einige Nachteile:

So ist ein zweizeitiger operativer Eingriff notwendig und es kann nur begrenzt Gewebe zur Transplantation entnommen werden, ohne einschränkende Gewebedefekte zu verursachen. Auch ist Knorpelgewebe nicht immer in ausreichender Menge oder Qualität vorhanden oder es kommt zu erneuten Defekten an der Entnahmestelle [26].

Eine Alternative zur ACT bildet die allogene Transplantation von Knorpelgewebe. Hier wird Material innerhalb derselben Spezies transplantiert. Bei dieser Methode wird nur ein operativer Eingriff benötigt und das Spendergewebe kann sorgfältig ausgewählt werden, was eine höhere Transplantatqualität gewährleistet. Auch kann ein einzelner Spender mehrere Empfänger versorgen. Jedoch sind immunologische Kontrollen und Gewebstypisierungen erforderlich, um Transplantatabstoßungen oder Infektionen zu verhindern [26].

Die xenogene Knorpeltransplantation, die Verpflanzung von Gewebe zwischen verschiedenen Spezies, findet klinisch kaum Anwendung und soll hier nur der

Vollständigkeit halber als weitere, eher theoretische Möglichkeit zur Verpflanzung von Knorpelgewebe genannt werden.

Da all die beschriebenen Möglichkeiten zur Knorpeltransplantation eine Reihe von Nachteilen aufweisen, ist die weitere Forschung nach einer suffizienten Therapiemöglichkeit ein wichtiges Ziel in der Medizin.

1.2 TISSUE ENGINEERING ZUM KNORPELERSATZ

Tissue Engineering entstand durch eine interdisziplinäre Kombination vieler neuer Entwicklungen in den Bereichen der Biologie, Materialforschung, Chemie, Physik und Medizin. Es ist ein aufstrebender Forschungszweig, der den dauerhaften und kosmetisch zufriedenstellenden Ersatz untergegangenen oder fehlenden Körpergewebes zum Ziel hat.

Erste Beispiele für Tissue Engineering können bereits 1933 gefunden werden, als Bisceglie mit einer Membran umhüllte Tumorzellen einer Maus in das Abdomen eines Hühnerembryos implantierte und das Überleben dieser Zellen nachweisen konnte [5].

Im Gegensatz zur Orthopädie, wo arthrosebedingte Gelenkknorpeldefekte bereits mit durch Tissue Engineering (TE) entwickeltem Knorpel therapiert werden, ist in der Kopf- /Halschirurgie die klinische Anwendung des Tissue Engineering noch nicht etabliert. Das liegt einerseits an starken Entzündungsreaktionen und Resorptionserscheinungen bei subkutanem Einbringen des Gewebekonstrukts und andererseits an den speziellen Ansprüchen an die äußere Form.

1992 und 1994 wurden durch die Arbeitsgruppe um Vacanti und Puelacher erste Schritte in diesem Bereich unternommen, indem Konstrukte in Form eines menschlichen Ohres, einer Trachea oder eines Nasenseptums entwickelt wurden. Die Chondrozyten hierfür stammten aus bovinem Gelenkknorpel.

Durch Rotter et al. und Haisch et. al. wurde gezeigt, dass Tissue Engineering von klinisch anwendbarem künstlich hergestelltem Knorpelgewebe mit humanen Chondrozyten möglich ist.

1997 wurde einem Patienten in der Charité in Berlin ein tissue-engineertes Ohr implantiert. Das Knorpelgewebe blieb für drei Wochen bestehen, bevor es resorbiert wurde und ein unbefriedigendes kosmetisches Ergebnis erzeugte.

Auch die im Jahre 2000 durch die plastische Chirurgie und Handchirurgie an der Universität Freiburg durchgeführten Versuche, einen Teildefekt am Ohr durch tissue-engineerten Knorpel zu versorgen, scheiterten an den starken Resorptionserscheinungen [58].

Das Prinzip des Tissue Engineering beinhaltet zwei typische Elemente: lebende und funktionstüchtige Zellen, die in vitro kultiviert und prozessiert werden, und ein formgebendes Trägermaterial, auf dem diese Zellen weiter wachsen können [32]. Die Chondrozyten stammen beispielsweise aus Rippenknorpel oder dem knorpeligen Nasenskelett und werden im Labor ausgesiedelt und prozessiert. Das Wachstum der Zellen kann hierbei mit verschiedenen Wachstumsmediatoren und -hormonen unterstützt werden. Haben sich die Chondrozyten ausreichend vermehrt, können sie auf ein (auch dreidimensionales) Trägerkonstrukt aufgebracht werden, welches in Größe und Form an die Bedürfnisse des Empfängers angepasst wird. Idealerweise können die Knorpelzellen in dieser Umgebung extrazelluläre Matrix produzieren und so ein Gewebekonstrukt bilden, das dem nativen Knorpel entspricht.

Essenziell für den Erfolg von TE sind die Wahl der Ursprungszellen und einer geeigneten Trägermatrix, sowie optimale Kulturbedingungen bei der Zellproliferation. Hier sollte auch angesetzt werden, um die bisherigen Ergebnisse und die Qualität des künstlichen Knorpelgewebes zu verbessern.

1.2.1 Zellmaterial

Die optimale Zellquelle für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe ist bisher nicht zufriedenstellend gefunden. Von Bedeutung sind hierbei Chondrozyten, Fibroblasten und Stammzellen, die durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und -hormonen genetisch modifiziert werden können.

Zur Therapie von Knorpeldefekten liegt die Verwendung von Chondrozyten nahe, sind sie doch gut aus nativem Knorpel (beispielsweise aus Rippen- oder Nasenknorpel) kultivierbar und fähig, Extrazelluläre Matrix (EZM) zu produzieren. Da die Knorpelzellen jedoch nur einen kleinen Prozentsatz am Knorpelvolumen ausmachen, müssen sie in Kultur expandiert werden, um suffiziente Zellzahlen zu bilden. Die Aussaat in Monolayerkultur führt allerdings oft zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten, die sich in einer verminderten Synthese von

Proteoglykanen und Kollagen Typ II und einer erhöhten Bildung von Kollagen Typ I bemerkbar macht [27, 28, 3].

Zusätzlich wird auch eine Veränderung der Zellmorphologie beschrieben: statt ihrer polygonalen bis runden Form nehmen die Knorpelzellen eine längliche und abgeflachte Form an [42]. Um dieser Dedifferenzierung entgegenzuwirken, können verschiedene Medienzusätze oder Wachstumsfaktoren [1, 8] wie beispielsweise Fibroblast Growth Factor-2 [45] eingesetzt werden.

Werden die Chondrozyten in einen dreidimensionalen Verbund eingebracht, kann ebenfalls eine Redifferenzierung der Zellen beobachtet werden [3]: sie erlangen wieder ihre typische runde Zellform und nehmen die Synthese von Kollagen Typ II und knorpelspezifischen Proteoglykanen wieder auf. Hier wird klar, dass die Redifferenzierung amplifizierter Chondrozyten eine wichtige Grundvoraussetzung des Tissue Engineering von Knorpelgewebe ist [58].

Für das Tissue Engineering mit Fibroblasten dient die Haut als Quelle. Hier können die Zellen minimalinvasiv und leicht zugänglich gewonnen werden. Unter geeigneten Kulturbedingungen entwickeln sie einen chondrozytenähnlichen Phänotyp: nach einer Vorbehandlung mit Insulin Like Growth Factor-I (IGF-I) und Kultur auf Aggrecan bilden Fibroblasten dichte Zellverbände, die – in histologischen Färbungen nachweisbar – GAG und Kollagen Typ II enthalten [24]. Lee et al. zeigten, dass Fibroblasten, die aktiven Transforming Growth Factor (TGF)- β -1 exprimierten und direkt in Knorpeldefekte injiziert wurden, nach sechs Wochen hyalinen Knorpel bildeten [40].

Eine weitere Quelle für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe sind Stammzellen. Diese Zellen sind pluripotent und können sich zu verschiedensten Zelllinien differenzieren. 1998 konnte gezeigt werden, dass Knochenmarksstammzellen von Kaninchen, denen TGF- β -1 zugegeben wurde, Chondrogenese ausführten [36]. Neben Knochenmark dienen Fettgewebe (mit dem Vorteil der minimalinvasiven Zellgewinnung) [75], Muskel [53], Synovia [56] und Periost [25] als Möglichkeiten zur Stammzellgewinnung.

Die Differenzierung von Chondrozyten aus embryonalen Stammzellen [67] ist ein neuer und bisher noch nicht ausreichend erforschter Ansatz. Die Zellen werden aus der inneren Zellmasse eines Embryos im Blastozystenstadium entnommen, können sich in alle somatischen Zellformen differenzieren und könnten theoretisch eine unbegrenzte Zahl an differenzierten Chondrozyten bereitstellen [34].

Jedoch stehen bisher die ethischen Aspekte, Schwierigkeiten bei der Zellselektion und Probleme mit der Antigenität einer klinischen Verwendung im Wege [72, 17].

1.2.2 Trägermaterial

Maßgeblich beteiligt am Erfolg des TE mit Knorpelgewebe ist die Wahl des passenden Trägermaterials. Idealerweise soll es ein stabiles Rahmenwerk bilden, in dem die Zellen wachsen, sich ausdifferenzieren und EZM produzieren können [29]. Ebenfalls soll die optimale Nährstoffversorgung, die Einbindung der Matrix in umgebenden nativen Knorpel und eine mechanische Stabilität gewährleistet sein. Bisher wurden bereits eine lange Reihe natürlicher und synthetisch hergestellter Materialien getestet.

Beispiele für natürliche Träger sind unter anderem Alginat [56], Agarose [13], Fibrin [19, 63], Kollagen [21] oder Zellulose [69]. Diese Polymere tragen Oberflächenrezeptoren, über die sie mit den Zellen kommunizieren können. Allerdings können bei der Verwendung der Biomaterialien Immunreaktionen hervorgerufen oder Krankheiten übertragen werden.

Synthetisch hergestellte Matrices bestehen beispielsweise aus Polyethylenglycol [9] oder Polyurethan [16]. Vorteile hierbei sind die gute Modifizierbarkeit, Reproduzierbarkeit und labormedizinische Anpassung des Konstrukts an die Anforderungen des Knorpelgewebes. Jedoch könnten eventuell entstehende Abfallprodukte Entzündungsreaktionen hervorrufen und die fehlende Interaktion zwischen der künstlich hergestellten Matrix und den Zellen die Eingliederung des Konstruktes in das Zielgewebe beeinträchtigen.

Um das Trägermaterial optimal an die Anforderungen und Bedürfnisse der Zellen und des späteren Zielgewebes anzupassen, werden verschiedene Gerüststrukturen verwendet: Hydrogele, Netze und Schwämme.

HYDROGELE sind stark wasserbindende, in Wasser jedoch nicht lösliche, dreidimensionale Netzwerke aus hydrophilen Polymeren. Durch ihren hohen Wasseranteil, ihre Elastizität und die Möglichkeit der Nährstoffdiffusion bietet sich die Verwendung von Hydrogelen als Trägermatrix für das TE mit Knorpelzellen an. Sie bieten den Zellen genug Platz, um sich einzunisten, zu proliferieren und zu differenzieren. Durch Behandlung des Gels mit Wachstumsfaktoren kann die

Zellentwicklung unterstützt werden. Hydrogele können als injizierbare Träger eingesetzt werden und Gewebsdefekte verschiedenster Größe und Form ausfüllen. Hiedurch erklärt sich allerdings auch ihr Nachteil beim Einsatz in der rekonstruktiven Kopf- Halschirurgie, da sie kein mechanisch stabiles Gerüst für Knorpeldefekte bilden können [17, 18, 38].

NETZE bestehen aus gewebten oder nicht-gewebten Fasern. Durch Veränderung des Faserdurchmessers, der Faserabstände oder der Fasernanordnung kann das Zellverhalten beeinflusst werden. Am häufigsten werden Netzgerüste aus Poly (α -hydroxy ester) verwendet, die seit den frühen 1990er Jahren in Gebrauch sind und Polyglykolsäure (PGA), Polylaktide (PLA), sowie deren Copolymere enthalten [17, 49, 41].

SCHWÄMME bilden ein stabiles, poröses Rahmenwerk um die implantierten Zellen. Porengröße, Vernetzung und Porosität bestimmen hierbei die Eigenschaften des Schwammes. Die Porengröße und Vernetzung sind wichtige Faktoren für die Zellinfiltration und -migration, sowie die Verteilung der EZM, die Porosität spielt eine große Rolle bei der Zelladhäsion [4]. Es gibt eine Vielzahl an Materialien, aus denen sich die Schwämme herstellen lassen. Alginat [48], Chitosan [54], Kollagen [68] oder Poly(1,8 octanediol citrate) (POC) [37] sind nur einige Beispiele dafür. Durch die hohe Formstabilität eignen sich Schwämme gut als Gerüst für Knorpeldefekte. Es können beispielsweise Konstrukte in Form des äusseren Ohres gegossen werden, die anschliessend mit Chondrozyten beimpft werden. Die dauerhafte Formstabilität und Eingliederung in das Zielgewebe sind wichtige Themen für weitere aktuelle und zukünftige Forschungen.

1.2.3 Kulturbedingungen

Um ausreichende Zellzahlen für die Besiedelung der Trägermatrices mit Chondrozyten zu gewinnen, müssen die Knorpelzellen in Zellkultur expandiert werden. Um die Zellentwicklung zu unterstützen und/oder zu beschleunigen, können verschiedene Stimulations- oder Wachstumsfaktoren eingesetzt werden. Bei TE mit mesenchymalen Stammzellen empfiehlt sich beispielsweise der Einsatz von Bone Morphogenic Protein (BMP), wodurch Mitose und Matrixproduktion der

Chondrozyten und die Entwicklung eines chondrozytenähnlichen Phänotyps stimuliert werden kann. Die Expansion der Chondrozyten in Kultur kann auch mit TGF- β unterstützt werden, wodurch sich die Expression von Kollagen Typ II und die Bildung von Glykosaminoglykanen steigern lassen [38]. Ein anaboler Effekt auf die Matrixsynthese der Knorpelzellen bei Zugabe von IGF! (IGF!)-1 wird von Fortier et al. beschrieben [20].

Bei TE mit Zellen aus Gelenkknorpel kann deren Eigenschaft, in einer sauerstoffarmen Umgebung mechanischen Kräften standhalten zu müssen, ausgenutzt werden: Durch hydrostatischen Druck werden diese Verhältnisse nachgeahmt und sollen die Chondrozyten zu einer verstärkten Synthese von Kollagen Typ II und einer gesteigerten Chondrogenese in vitro anregen. Freed et al. beschrieben 1994 eine schnellere Zelladhäsion und -ausbreitung durch dynamische Zellaussaat auf porösen Trägermaterialien, indem sogenannte Spinner Flasks verwendet wurden [22]. Ein neuerer Ansatz für diese Form der Zellaussaat ist der Gebrauch von Bioreaktoren. Hierbei kann im Vergleich zu der Verwendung von Spinner Flasks eine erhöhte Zellproliferation der Chondrozyten und vermehrte Bildung von EZM beobachtet werden [10].

1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit war die Anzüchtung humaner Chondrozyten auf dem neuartigen Träger Novocart® 3D im Hinblick auf die Tauglichkeit des Materials zur Deckung von Knorpeldefekten in der Kopf- Hals- Chirurgie.

Die einzelnen Versuchsreihen umfassten die Untersuchung des Trägermaterials in vitro, unterschiedliche Beimpfungsstrategien zur Optimierung der Zellaufbringung und -infiltration in das Trägergewebe, die Modifikation der aufgeimpften Zellzahl, sowie die Anpassung des Kulturmediums. Es wurden histologische Färbungen erstellt und biochemische Analysen durchgeführt, um die Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

Teil II

MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL UND METHODEN

2.1 PATIENTENDATEN UND -MATERIAL

Für die Arbeit wurde humaner septaler Nasenknorpel verwendet, der insgesamt 23 Patienten, 14 davon männlichen und neun weiblichen Geschlechts, im Rahmen einer Septum- oder Septorhinoplastik im Klinikum rechts der Isar entnommen wurde. Dabei handelte es sich ausschließlich um Material, das nach dem Eingriff verworfen worden wäre. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 34,9 Jahre, der Median lag bei 29 Jahren.

Die Knorpelbiopsien wurden nach der operativen Entfernung in Vollmedium (40 ml **DMEM** (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) mit 2,5% Antibiotic, Antimycotic (**AA**) (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) und 10% Fetales Kälberserum (**FKS**) (Biochrom AG, Berlin, D)) bei 8 °C bis zur weiteren Verarbeitung im Labor aufbewahrt.

2.2 TRÄGERMATERIAL

Als Träger für die Besiedelung mit Chondrozyten wurde der aus Kollagen Typ I und Chondroitinsulfat bestehende Schwamm Novocart® 3D der Firma TETEC (Reutlingen, D) verwendet.

Das Gerüst von Novocart® 3D ist komplex aufgebaut: es besteht aus einem unteren Teil mit ungerichtet angeordneten, kammerbildenden Kollagensträngen, der als abschließende Membran fungiert und das Eindringen anderer Zellen aus der Umgebung (zB. der Synovia) und das Abdiffundieren der angesiedelten Zellen verhindern soll. Der darüber liegende Teil des Schwammes enthält säulenartig zur Oberfläche verlaufende, offene Kollagenbanden, die durch feine interkonnektierende Fasern miteinander verbunden sind und eine gleichmäßige, dreidimensionale Anordnung der Zellen innerhalb der Matrix ermöglichen. Auf

diese Seite werden die Chondrozyten ausgesät. Die Porosität des Schwammes ist mit ca. 10 - 100 µm Porengröße hoch [55].

Die Abbildung 2.1 zeigt die HE- Färbung der Übersichtsaufnahme der Trägermatrix. Dargestellt ist das Maschenwerk des Trägers, in das sich die Knorpelzellen nach der Beimpfung einnisten sollen. Gut zu erkennen sind die beiden Phasen der Matrix: Die obere, säulenartig angeordnete Phase und senkrecht dazu die abschließende Membran.

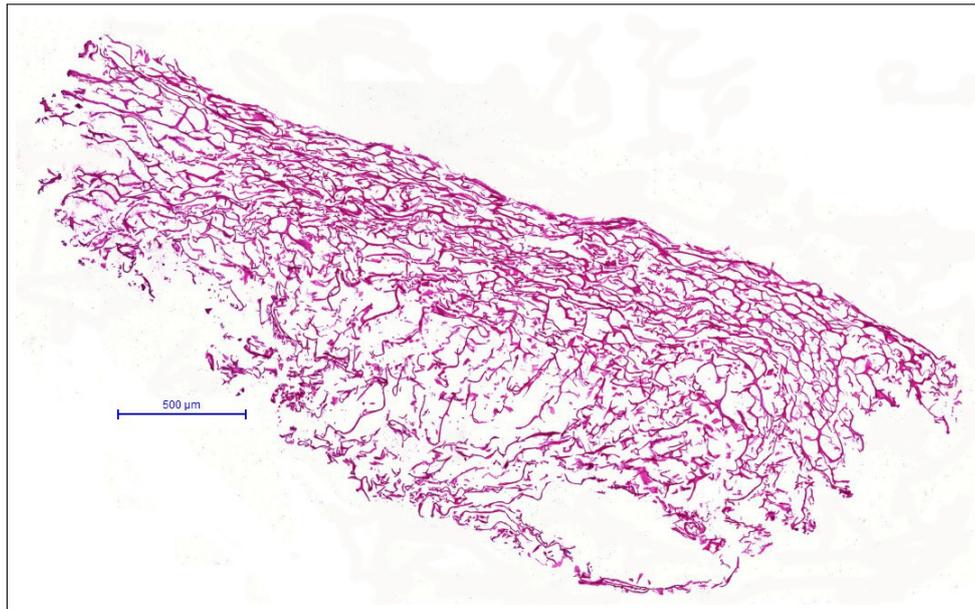


Abbildung 2.1: Novocart ®3D, Leeraufnahme, Färbung: HE, Vergr. 3,5fach

Grafik 2.2 stellt die rasterelektronenmikroskopischen Leeraufnahmen des Trägers Novocart ®3D dar (freundlicherweise durchgeführt durch das Institut für plastische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar). Fig. 1 und 2 zeigen die Oberfläche der Matrix. Gut sichtbar sind die Kollagensäulen mit den waagrecht dazu ausgerichteten Querfasern, in die sich die Chondrozyten später einnisten sollen. Fig. 3 und 4 bilden die Unterseite des Trägers ab. Dargestellt ist die abschließende Membran, die die angesiedelten Zellen einerseits vom Austreten aus dem Konstrukt und Fremdmaterial vor dem Eindringen in die Matrix hindern soll.

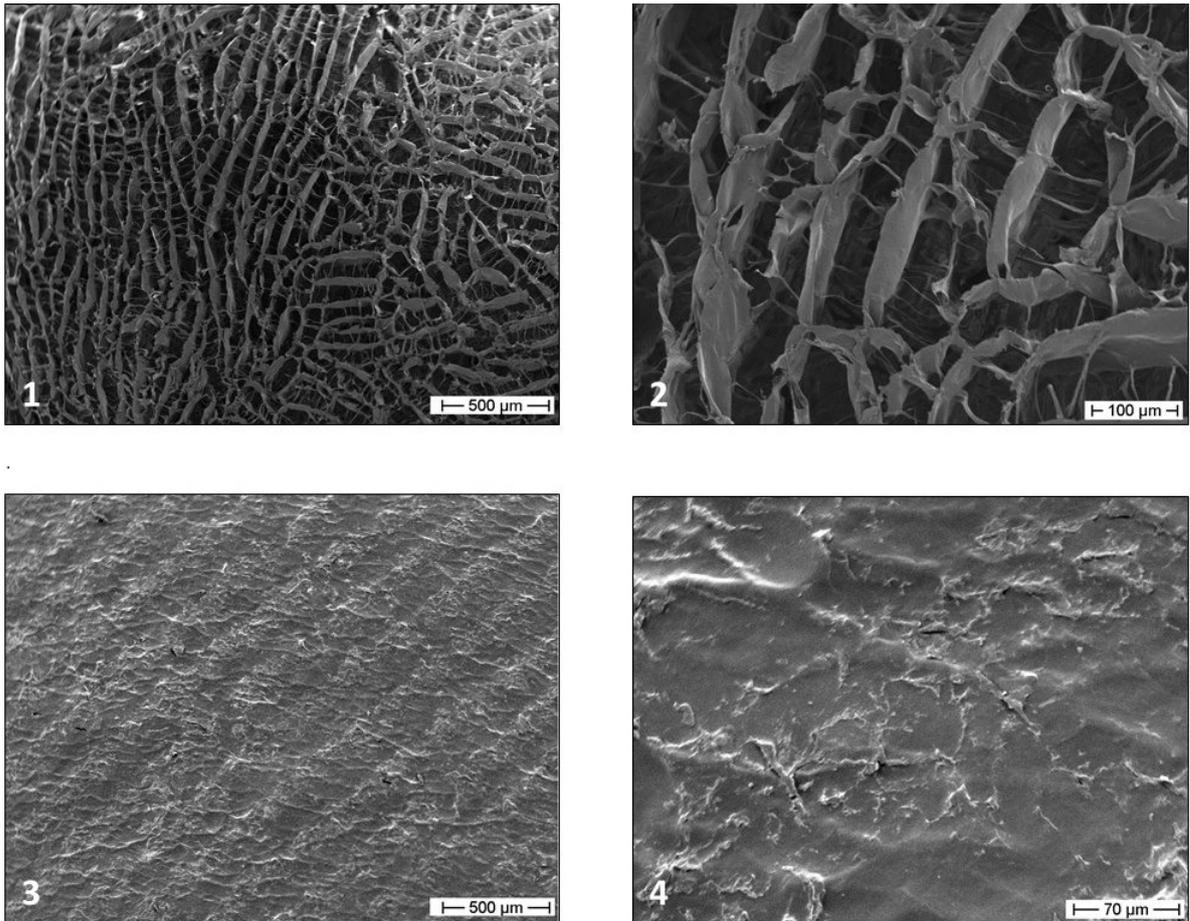


Abbildung 2.2: Novocart ®3D, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Fig. 1 und 2: Aufnahme der Trägeroberfläche. Gut erkennbar sind die säulenförmig angeordneten Kollagenbalken mit den interkonnektierenden Fasern (Fig. 1: 50x, 3kV, WD 10 und Fig. 2: 350x, 3kV, WD 10), Fig. 3 und 4: Aufnahmen der abschirmenden Membran (Fig. 3: 50x, 3kV, WD 10 und Fig. 4: 350x, 3kV, WD 10)

2.3 ZELLKULTURTECHNIKEN

2.3.1 Gewebeerddau

Die Knorpelbiopsien wurden zuerst mit Phosphate buffered saline (PBS) - Puffer (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) gespült und danach in einer Petrischale (Sarstedt, Nümbrecht, D) mit einem Skalpell (Feather, pfm medical, Köln, D) sorgfältig von Blut - und Gewebsresten befreit. Um die Angriffsfläche für den

Kollagenaseverdau zu vergrößern, wurde der Knorpel in etwa 1 mm^3 kleine Stücke zerschnitten.

Das zerkleinerte Gewebe wurde in eine 25 cm^2 große Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht, D) gefüllt, gewogen und gewichtsabhängig mit $3 \text{ ml} / \text{g}$ Knorpel einer 2 mg/ml Collagenase-II-Lösung (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) vermischt. Diese Verdauungslösung wurde im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 für 8 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Verdauzeit wurde die Lösung durch einen Cellstrainer ($100\mu\text{m}$, BD Biosciences, Bedford, USA) in einen Zentrifugenfalcon (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt und bei 2000 revolutions per minute (rpm) und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das entstandene Zellpellet in frischem Vollmedium mittels Pasteurpipette (Sarstedt, Nümbrecht, D) resuspendiert.

Abschließend wurden die Zellen ausgezählt, auf Vitalität geprüft und als Monolayer - Kultur in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht, D) ausgesät.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zahl der vitalen Zellen zu ermitteln, wurde die Trypanblaumethode gewählt. Hierbei wird sich die Eigenschaft der $0,4 \%$ igen Trypanblaulösung zu Nutze gemacht, in beschädigte und avitale Zellen eindringen zu können. Diese Zellen werden so tiefblau angefärbt und können im Mikroskop von den hellen, vitalen Zellen unterschieden werden.

Dazu wurden $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $10 \mu\text{l}$ Trypanblau (Sigma - Aldrich, Steinheim, D) vermischt und wiederum $10 \mu\text{l}$ von dieser Mischung in eine Neubauer Zählkammer (Brand, D) gegeben. 16 Kästchen der Zählkammer wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und somit die Lebendzellzahl pro ml ermittelt.

2.3.3 Monolayer-Kultur

Nach der enzymatischen Isolierung der Chondrozyten, wurden die Zellen mit einer Dichte von $10000 \text{ Zellen/cm}^2$ in 75 cm^2 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, D) ausgesät und im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 kultiviert. Versorgt

wurden sie durch 20 µl **DMEM** (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) pro Zellkulturflasche, welches mit 2,5% **AA** (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) und 10% **FKS** (Biochrom AG, Berlin, D) versetzt und je nach Verbrauch alle drei bis fünf Tage gewechselt wurde. Nach sieben bis 12-tägiger Inkubation waren die Chondrozyten zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen und konnten abgeerntet werden.

Dazu wurde das Medium mit einer gläsernen Pipette (Sarstedt, Nümbrecht, D) abgesaugt, die Zellkulturflasche zweimal gründlich mit **PBS** gespült und 2 ml einer 0,05 % Trypsin- EDTA- Lösung (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) hinzugegeben. Unter mikroskopischer Sicht wurde die vollständige Ablösung der Zellen von dem Flaschenboden kontrolliert und mittels Zugabe von 4 ml Vollmedium die Trypsinwirkung antagonisiert.

Die so entstandene Zelllösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 37 °C und 2000 **rpm** zentrifugiert. Das Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in frischem Vollmedium resuspendiert. Mittels der oben beschriebenen Trypanblaumethode wurde die Zahl der vitalen Zellen ermittelt.

Um die Zellausbeute zu erhöhen wurden die Chondrozyten passagiert, also auf zwei bis vier neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Bis zur endgültigen Besiedelung der Trägermatrix wurden die Zellen zweimal passagiert.

2.4 BESIEDELUNG DER TRÄGERMATRIX NOVOCART®3D

Für die Besiedelung wurden aus den Novocart - Matrices mit einer 5 mm Biopsie-Punch (Stefel, Wächtersbach, D) 2 mm hohe, runde Konstrukte ausgestanzt. Das experimentell ermittelte Fassungsvermögen dieser Plättchen lag bei 40 µl. Nach ausreichender Amplifizierung der Chondrozyten in Kultur konnten diese nun auf die vorbereiteten Konstrukte aufgebracht werden.

Dazu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und diese gründlich mit **PBS** gespült. Um die Zellen von dem Kulturflaschenboden abzulösen, wurden 2 ml Trypsin - EDTA -Lösung hinzugegeben und die vollständige Ablösung der Chondrozyten unter mikroskopischer Sicht kontrolliert. Die Trypsinwirkung wurde daraufhin durch Zugabe von 4 ml Vollmedium antagonisiert. Diese

Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 10 min bei 37 °C und 2000 rpm zentrifugiert.

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 1 ml Vollmedium resuspendiert und mittels Trypanblaumethode gezählt. Danach wurde die Zelllösung erneut zentrifugiert, um das vorher beigemischte Medium wieder von den Zellen zu trennen. Der flüssige Überstand wurde abgegossen und Mediumreste vorsichtig mit der gläsernen Saugpipette abgezogen.

Für eine Beimpfung mit einer Millionen Zellen pro Konstrukt wurden pro ausgezählter Million Zellen 40 µl Vollmedium mit der Eppendorf- Pipette (eppendorf research) zugegeben und gründlich vermischt. Nun konnten 40 µl dieser Zellsuspension abgenommen werden und auf die in einer 24 Well - Plate (Sarstedt, Nümbrecht, D) (ein Konstrukt pro Well) liegenden Novocart - Plättchen aufgebracht werden. Dazu wurden die 40 µl mit einer Eppendorf - Pipette aufgezogen und mit leichtem Druck direkt auf die Oberfläche des Plättchens gegeben. Durch leichtes Zusammendrücken des Konstruktes wurde die Flüssigkeit in das Plättchen eingesaugt. 15 Minuten nach der Beimpfung wurden in jedes Well 3 ml Vollmedium hinzugegeben und die Well-Plate für die Kultivierung in den Brutschrank gestellt. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage erneuert.

2.5 AUFBAU DER VERSUCHSREIHEN

2.5.1 *Versuchsreihe 1*

Um Optimierungsmöglichkeiten des Beimpfungsvorgangens zu untersuchen, wurden drei verschiedene Beimpfungsstrategien verglichen. Es wurden insgesamt 12 Konstrukte mit Chondrozyten besiedelt und über eine Woche kultiviert. Vier dieser Konstrukte wurden vor der Beimpfung für 15 Minuten in 70%igem Ethanol eingeweicht. Bei vier Trägerplättchen wurden die Chondrozyten mit einer Sterican - Kanüle (Gr. 1, 0,90 x 40mm, BRAUN, Melsungen, D) direkt in das Konstrukt eingespritzt. Die letzten vier Konstrukte wurden während der Beimpfung mit der Pipette forciert mechanisch eingedrückt, um die Zellen mittels Kapillarwirkung in den Träger hineinzuziehen.

2.5.2 *Versuchsreihe 2*

Die zweite Versuchsreihe beschäftigt sich mit dem Wachstum der Zellen hinsichtlich unterschiedlicher Zellzahlen und Kultivierungszeiträumen. Es wurden insgesamt 132 Konstrukte mit Chondrozyten beimpft: 33 mit einer halben Million, 33 mit einer Million, 33 mit zwei Millionen und 33 mit drei Millionen. Nach drei, fünf und sieben Wochen wurden jeweils 11 der 33 beimpften Träger für die Histologie und die biochemischen Assays aufgearbeitet.

2.5.3 *Versuchsreihe 3*

Hier sollte die Entwicklung der Chondrozyten auf den Konstrukten über verschiedene Zeiträume untersucht werden. Dazu wurden insgesamt 30 Konstrukte beimpft:

10 davon mit einer Million, 10 mit zwei Millionen und 10 mit drei Millionen Zellen. Nach zweieinhalb Wochen wurden die Konstrukte für die histologische Aufarbeitung entkalkt und in Paraffin überführt.

2.5.4 *Versuchsreihe 4*

Ziel der vierten Versuchsreihe war, das Verhalten des Trägermaterials Novocart 3D *in vitro* und bei der Beimpfung mit Chondrozyten zu untersuchen. Dazu wurden insgesamt 30 Konstrukte mit je einer Million Chondrozyten beimpft. Nach drei Wochen nach Inkubation wurden sechs davon für Paraffinschnitte aufgearbeitet und vier für die biochemischen Assays eingefroren. Diese Prozedur wurde fünf und sieben Wochen nach Inkubation wiederholt.

2.5.5 *Versuchsreihe 5*

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 12 Trägerkonstrukte beimpft: vier mit einer Million Zellen, vier mit zwei Millionen Zellen und vier mit drei Millionen Zellen. 24 Stunden nach Beimpfung wurden die "Verlustzellen" ausgezählt. Dazu wurden zuerst die besiedelten Konstrukte aus ihren Wells entfernt. Das Medium, welches nach der Beimpfung zu den Konstrukten hinzugegeben worden

war, wurde abgenommen und in ein Zentrifugenfalcon gefüllt. Die am Well-Plate- Boden haftenden Chondrozyten wurden mit Trypsin benetzt und ihre Ablösung unter dem Mikroskop kontrolliert. Danach wurde die Trypsinwirkung mit Vollmedium antagonisiert und die entstandene Zellsuspension ebenfalls in das Zentrifugenfalcon überführt.

Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 2000 rpm konnte der flüssige Überstand abgegossen und das entstandene Zellpellet 1 ml Vollmedium resuspendiert werden. 10 µl dieser Suspension wurden mit 10 µl Trypanblau vermischt und wiederum 10 µl dieser Lösung in eine Neubauer Zählkammer gegeben. So konnten die Chondrozyten, die sich nicht auf dem Trägerkonstrukt befanden, ausgezählt werden.

2.5.6 Versuchsreihe 6

In dieser Versuchsreihe wurden die Konstrukte mit Chondrozyten aus der Primärkultur besiedelt. Dabei wurden die Zellen nach dem Verdau direkt in den Zellkulturflaschen ausgesiedelt und nicht mehr weiter passagiert. Zur Optimierung des Nährmediums wurden zwei verschiedene Medien verwendet und miteinander verglichen:

20 Zellkulturflaschen wurden mit Vollmedium (DMEM, 2,5% AA, 10% FKS), dem 500 µl Insulin beigefügt wurde, befüllt.

Weitere 20 Zellkulturflaschen wurden mit CGM (PromoCell, Heidelberg, D) versehen. Die genauen Inhaltsstoffe des CGM sind laut Hersteller vertraulich, aber optimiert für die Kultivierung humaner Chondrozyten.

Nachdem die Primärkultur konfluent auf dem Kulturflaschenboden angewachsen waren, wurden 8 Konstrukte mit jeweils einer Million aus der Zellkultur mit DMEM + Insulin und 8 Konstrukte mit jeweils einer Million aus der Kultur mit CGM besiedelt. Danach wurden die beimpften Konstrukte auf einer 24 - Well - Plate aufgeteilt und mit ihrem zugeteilten Medium bedeckt. Zwei und fünf Tage nach Besiedelung wurden die Konstrukte aus ihren Wells entfernt, um für die histologische Auswertung und die biochemischen Assays weiterverarbeitet zu werden.

2.5.7 *Versuchsreihe 7*

Zur Untersuchung der Vitalität und Differenzierung der Chondrozyten, wurden in dieser Versuchsreihe die Zellen einmal passagiert. Danach wurden sie in Chamberslides direkt auf Objektträgern angesiedelt und mit Vollmedium bedeckt. Nachdem die Zellen auf den Objektträgern zu einem dichten Zellrasen gewachsen waren, wurden sie in 4%igem Formalin fixiert, um danach für die histologische Auswertung gefärbt zu werden.

2.6 PRÄPARATIONSMETHODEN

2.6.1 *Aufbereitung für die Histologie*

Um das Gewebe histologisch auswerten zu können, musste es zuerst fixiert werden. Dazu wurden die Konstrukte in einen Eppendorf - Tube gegeben, mit einer wässrigen Formalinlösung (mit 4% Formaldehydgehalt) bedeckt und für mindestens 24 Stunden so belassen. Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, durchliefen die Konstrukte zum Entkalken eine aufsteigende Alkoholreihe, wurden mit Xylol behandelt und anschließend mit heißem Paraffin durchtränkt. So konnten die Konstrukte in einer Einbettkassette mit Paraffin übergossen und zu einem Paraffinblock verarbeitet werden. Nachdem das Paraffin ausgehärtet war, konnte der Block aus seiner Gießform geschlagen werden.

2.6.2 *Färbemethoden*

2.6.2.1 *Hämatoxylin - Eosin*

Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin - Eosin - Färbung nach Mulisch et al. [52] verwendet. Dazu wurden die Schnitte zuerst zweimal für jeweils fünf bis zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigende Alkoholreihe gewässert. Nach einer gründlichen Spülung mit Aqua dest. (BRAUN, Meisungen AG, Meisungen, D) wurden die Objektträger für sieben Minuten in Mayer's Hä-malaun getaucht und danach in fließendem Leitungswasser für zehn Minuten gebläut. Daraufhin folgte die Zytoplasmafärbung durch fünfminütiges Eintau-

chen der Schnitte in 0,1%igem Eosin. Die Objektträger wurden kurz mit Aqua dest. abgspült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nun wurde der Alkohol durch zweimaliges, jeweils fünfminütiges Eintauchen in Xylol entfernt und die Schnitte mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, D) eingedeckt. Zum Antrocknen der Schnitte wurden die Objektträger für 30 Minuten im Brutschrank bei 60 °C gelagert.

2.6.2.2 Alcianblau - Kernechtrot

Zum Nachweis von sauren Mucinen wie GAG diente die Alcianblau - Kernechtrot - Färbung. Die Schnitte wurden durch zweimaliges, jeweils fünfminütiges Eintauchen in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschließend fünf Minuten mit Aqua dest. behandelt. Nachdem die Objektträger für fünf Minuten mit einer 1%igen Alcianblaulösung angefärbt worden waren, wurden sie für drei Minuten mit lauwarmen Leitungswasser gespült. Nach fünfminütigen Eintauchen in Aqua dest. wurden die Schnitte zehn Minuten mit Kernechtrot gegengefärbt. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und durch zweimaliges, fünfminütiges Eintauchen in Xylol geklärt. Schließlich wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und 30 Minuten im Brutschrank bei 60 °C gelagert.

2.6.2.3 Safranin - O

Als weitere knorpelspezifische Färbung wurde die Safranin - O - Färbung verwendet.

Hierbei wurden die Schnitte zuerst durch zweimaliges, fünfminütiges Eintauchen in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und danach für fünf Minuten in Aqua dest. getaucht. Die Objektträger wurden nun für fünf Minuten mit Hämalau gefärbt und anschließend mit fließendem lauwarmen Leitungswasser gebläut. Es folgte dreimaliges Eintauchen der Schnitte in eine Lösung aus 200 ml 70% igem Ethanol und 500 µl hochkonzentrierter Salzsäure. Nun wurden die Objektträger unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser gespült und für fünf Minuten mit Fast Green angefärbt. Nachdem die Schnitte für einige Sekunden mit 1%iger Essigsäure gewaschen worden waren, wurden sie für fünf Minuten in 0,1%iges Safranin - O getaucht. Anschließend wurden die Objektträger für wenige Sekunden mit Aqua dest. behandelt und in einer

aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Zum Schluss wurden sie zweimal für fünf Minuten in Xylol getaucht, danach mit Eukitt eingedeckt und zum Antrocknen für 30 Minuten im Brutschrank bei 60 °C gelagert.

2.6.2.4 *Immunhistochemie*

Immunhistochemisch wurde Kollagen II mittels AP - gelabelter Antikörper nachgewiesen. Dazu mussten die Schnitte zuerst entparaffiniert werden und wurden dazu zweimal für fünf Minuten in Xylol getaucht. Danach durchliefen sie zur Rehydrierung die absteigende Alkoholreihe. Die so behandelten Schnitte wurden in einer mit etwas Aqua dest. befüllte feuchten Kammer aufgereiht.

Es folgte die enzymatische Demaskierung.

Hier wurden die Objektträger zuerst fünf Minuten mit Aqua dest. gespült. Nachdem das Wasser von den Slides sorgfältig abgetupft worden war, wurden sie zurück in die feuchte Kammer gebracht und verblieben für zehn Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Daraufhin wurden die Schnitte mit Pepsin (Zytomed, Berlin, D) betropft und anschließend für dreimal zwei Minuten mit PBS gewaschen. In der feuchten Kammer wurden die Slides nun für mindestens fünf Minuten mit der Block - Solution inkubiert. Danach wurden die Objektträger zwei Minuten lang mit Phosphate buffered saline + TWEEN (PBST) gewaschen und schließlich in der feuchten Kammer mit einem Tropfen verdünnten Antikörper (1000 µl Antibody Diluent mit 5 µl Antikörper, Zytomed, Berlin, D) versehen. Die Schnitte wurden so über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Slides für drei bis fünf Minuten mit PBST gewaschen und wieder in der feuchten Kammer aufgereiht. Es folgte die Zugabe des Postblock Reagenz für 20 Minuten, danach fünfminütiges Waschen mit PBST. Für zehn Minuten wurde Permanent AP Red (Zytomed, Berlin, D) auf die Schnitte geträufelt und anschließend mit Aqua dest. vorsichtig wieder abgewaschen.

Nun wurde für zehn Minuten mit Hämalaun gegengefärbt und die Objektträger danach unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte durchliefen zur Dehydrierung schließlich die aufsteigende Alkoholreihe und wurden danach mit Eukitt eingedeckt.

2.7 BIOCHEMISCHE VERFAHREN

2.7.1 *Papainverdau*

Zur Herstellung des für den Papainverdau benötigten PBE - Puffers wurden 7,1 g Na_2HPO_4 und 1,86 g Na - EDTA in 500 ml Aqua dest. gelöst. Diesem PBE - Puffer wurden nun 875 mg L - Cystein hinzugefügt, so dass ein 0,014 molarer L - Cystein - PBE Puffer entstand.

Nach diesen Vorbereitungen konnte die Papainlösung angesetzt werden. Diese Lösung musste immer frisch hergestellt werden.

Pro Milliliter PBE - Puffer wurden 0,125 mg Papain (Sigma - Aldrich, Steinheim, D) gelöst. Durch mehrfaches Vortexen konnte die vorerst trübe Lösung aufgeklärt werden. Im nächsten Schritt wurde das Konstrukt in einem 2 ml - Eppendorfreaktionsgefäß mit Hilfe einer feinen chirurgischen Schere zerkleinert und mit 1 ml der Papain - PBE - Verdauungslösung versetzt. Dieser Verdauungsansatz inkubierte anschließend für 16 Stunden bei 60 °C im Wasserbad.

So aufgearbeitet konnten die verdauten Konstrukte biochemisch analysiert werden und wurden daraufhin bei - 20 °C kryokonserviert.

2.7.2 *Quantifizierung des GAG- Gehalts mittels DMMB - Assay*

Mit Hilfe dieses Assays lassen sich GAG biochemisch quantifizieren. Diese sind Bestandteil der wasserbindenden Proteoglykane der Knorpelmatrix und tragen somit wesentlich zur elastischen Festigkeit des Knorpels bei[71].

Der in diesem Assay verwendete Farbstoff 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB) bewirkt durch Verbindung mit sulfatierten GAG einen blauen Farbumschlag, dessen Absorption bei 523 nm mit dem Photometer messbar ist. So wird ein indirekter Nachweis der GAG ermöglicht.

Zuerst wurde die Standardkurve bestimmt, gegen die im späteren Verlauf des Assays die Konstruktproben gemessen werden sollten: Dazu wurde in einer 96 - Wellplate aus Chondroitinsulfat und PBE - Puffer eine Verdünnungsreihe angefertigt. Pro Well befanden sich 50µl Chondroitinsulfat-Lösung, der 200 µl DMMB hinzugefügt wurde. So ergab sich eine ansteigende Standardverdünnungs-

reihe der Konzentrationen 0,156 µg/ml, 0,3125 µg/ml, 0,625 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml.

Zur Auswertung der besiedelten Konstrukte wurden 50 µl des Papainverdaus mit 200 µl **DMMB** vermischt.

Nun wurde der **GAG**- Gehalt durch Bestimmung der Extinktion des oben beschriebenen Farbumschlags gemessen. Dies geschah durch ein computerunterstütztes Photometer (MikroWin 2000) bei einer Absorbance von 523 nm.

Die Extinktionen der Standardverdünnung wurden zweifach, die der Proben dreifach bestimmt.

Durch Überführen der ausgewerteten Daten in eine Excel-Tabelle konnte schließlich die Geradengleichung ermittelt werden.

2.7.3 Bestimmung des **DNA** - Gehalts mittels Hoechst - Assay

Kim et al. [39] beschreiben in ihrer Arbeit die Möglichkeit, über Messung der Gesamt - **DNA** mit dem Bisbenzimidazolfarbstoff Hoechst 33258, indirekt den Zellgehalt eines Konstruktes zu ermitteln. Für einen Chondrozyten wurde dabei ein **DNA** - Gehalt von 7,7 pg festgelegt.

Zur Herstellung der Stocklösung für diesen Assay wurde der Hoechst - Farbstoff in einer 1 mg/ml Konzentration in Aqua dest. gelöst. Diese Lösung wurde in einem Polypropylen - Falcon lichtgeschützt bei 7 °C gelagert. So aufbewahrt, blieb die Stocklösung sechs Monate stabil.

Die Worksolution musste stets frisch hergestellt werden. Dazu wurden 10 µl der Stocklösung in 10 ml TEN - Puffer gelöst.

Zur Erstellung einer Standardverdünnungskurve wurde Kalbsthymus - **DNA** in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet, die nach folgendem Schema mit TEN - Puffer und der Hoechst - Färbelösung gemischt wurde:

Von diesen Verdünnungslösungen wurden jeweils 250 µl abgenommen und in die Wells einer 96 - Well - Plate pipettiert.

Für die Probenmessung wurden 50 µl des Probenverdaus mit 50 µl TEN - Puffer verdünnt. Dazu wurden anschließend 2000 µl Worksolution hinzugegeben. 250 µl dieser Lösung wurden nun abgenommen und in die Vertiefungen einer 96 - Well - Plate pipettiert.

	<i>DNA- Stocklösung (10 µg / ml)</i>	<i>TEN-Puffer</i>	<i>Hoechst-Färbelösung</i>
1	0 µl	100 µl	2000 µl
2	5 µl	95 µl	2000 µl
3	10 µl	90 µl	2000 µl
4	20 µl	80 µl	2000 µl
5	30 µl	70 µl	2000 µl
6	40 µl	60 µl	2000 µl

Tabelle 2.1: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe

Die fluorimetrischen Messungen wurden mit einem computerunterstützten Photometer (MikroWin 2000) durchgeführt. Die Emissionswellenlänge lag dabei bei 460 nm, die Exzitationswellenlänge bei 355 nm.

Die Messungen der Standardverdünnungsreihe wurden zweimal, die der Proben viermal durchgeführt und die relevanten Messwerte in eine Excel - Datei überführt, um die Geradengleichung zu bestimmen.

2.7.4 Statistische Auswertung der biochemischen Assays

Gängige statistische Methoden, um Mittelwertunterschiede (z.B. im DNA-Gehalt) zwischen verschiedenen Gruppen (z.B. Gruppen unterschiedlicher Zellzahlen) bzw. über die drei erhobenen Messzeitpunkte auf statistische Signifikanz zu prüfen (z.B. t-Test für abhängige Stichproben, ANOVA, Wilcoxon-Test, etc.), konnten in der vorliegenden Untersuchung aufgrund zu kleiner Stichprobengrößen (z.B. N=2 Personen) nicht zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund wurden lediglich deskriptive Trends beschrieben, wobei eine bedeutsame Veränderung als Mittelwertunterschied von mehr als zwei Standardabweichungen festgelegt wurde. Die vorliegenden Ergebnisse liefern also erste Hinweise auf mögliche Unterschiede oder Veränderungen.

Teil III

ERGEBNISSE

ERGEBNISSE

3.1 KNORPELISOLIERUNG

Zur ausreichenden Besiedelung der Konstrukte mussten die aus der Knorpelbiopsie gewonnenen Chondrozyten zur Proliferation angeregt werden. Das Verfahren zur Expansion der Einzelzellen konnte im Verlauf der Arbeit stetig optimiert und am Schluss fehlerfrei reproduziert werden. Durch Poolen der Biopsien konnten einheitliche Versuchsbedingungen geschaffen werden. Trotz Isolierung der Chondrozyten aus ihrem Knorpelzellverband waren die Zellen vital, was durch die Trypanblau - Methode und die direkte Anzucht auf Chamberslides gezeigt werden konnte.

3.2 MONOLAYERKULTUR

In Zellkulturflaschen gebracht, proliferierten die Zellen rasch zu einem homogenen konfluenten Zellrasen am Flaschenboden. Nach zwei Passagen konnten ausreichend viele Zellen für die Besiedelung der Konstrukte abgeerntet werden. Nach einigen Tagen in Monolayerkultur konnten morphologische Veränderungen der Zellen festgestellt werden: Die frisch isolierten Chondrozyten zeigten einen runden bis polygonalen Phänotyp, wohingegen die kultivierten Zellen eine längliche, fibroblastenähnliche Zellform ausbildeten.

3.3 3D - KULTUR

Nach drei bis vier Wochen in Monolayer - Kultur wurden die passagierten Chondrozyten, gelöst in 40 µl einer Medium-Zell-Suspension, auf die ausgestanzten Novocart ®3D - Konstrukte übertragen. Die Zelllösung wurde ohne vorangegangene Manipulation am Konstrukt oder Verwendung von Hilfsmitteln auf die Matrix aufpipettiert und durch Kapillarwirkung in den Schwamm hineingezogen.

Die besiedelten Konstrukte verblieben bis zu ihrer Weiterverarbeitung in Wellplattes.

3.4 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHEN

3.4.1 *Versuchsreihe 1*

3.4.1.1 *Histologie*

Die AB-Färbung Abbildung 3.1 des mit 70%-igem Ethanol vorbehandelten Trägermaterials zeigt in der Übersichtsaufnahme ein skelettartiges Aussehen der Trägermatrix. Die Kollagenbälkchen erscheinen ausgedünnt und brüchig. Es lassen sich nur wenige Zellen innerhalb des Konstruktes beobachten, die sich vor allem am Randbereich und um einen Hohlraum innerhalb des Trägers konzentrieren. Auch in der 10fachen Vergrößerung (Abbildung 3.51) finden sich nur wenige längliche Zellen mit schmalen Zellkern im Gitterwerk des Konstruktes. Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis der Beimpfung mittels Kanüle. Die Zellen konzentrieren sich um den Stichkanal der Kanüle und dringen nicht weit in das Gitternetz des Trägers vor. Die 15fache Vergrößerung 3.4 zeigt spindelförmige, dedifferenzierte Zellen mit schmalen Zellkörper. Für diese Färbung blau schimmernde GAG sind nicht zu erkennen. Die Knorpelzellen, die durch forcierten Druck der Impfpipette auf das Konstrukt aufgebracht und durch Kapillarwirkung in den Träger hineingesogen wurden, werden auf Abbildung 3.5 dargestellt. Die Zellen sind dicht um einen Hohlraum innerhalb der Trägermatrix angesiedelt und dringen nur vereinzelt durch das Konstrukt hindurch. Die 40fach vergrößerte Nahaufnahme 3.6 aus dem Areal mit dichter Zellbesiedelung zeigt gut in das Gitterwerk des Trägers integrierte, eng beieinander liegende Zellen. Zwischen den Zellköpern finden sich in der AB-Färbung bläulich angefärbte GAG-Ablagerungen. Die Zellen selbst erscheinen klein, teilweise spindelförmig und dedifferenziert.

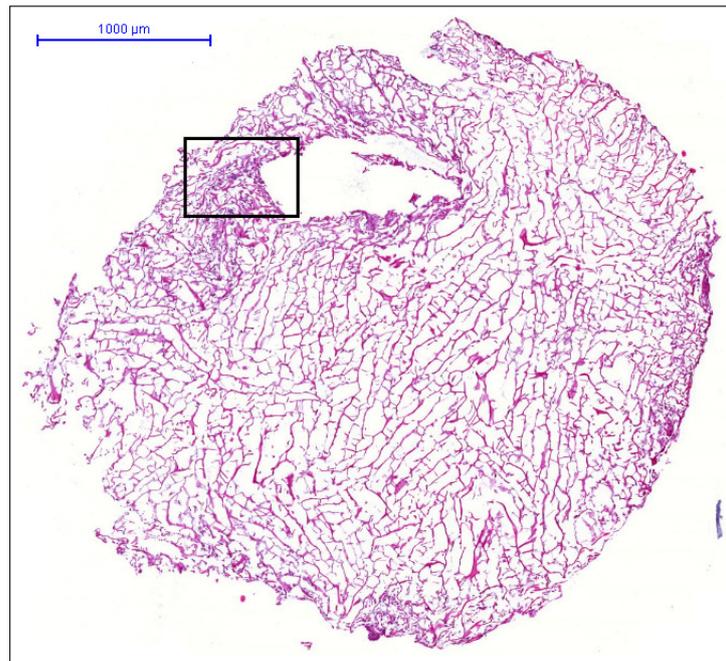


Abbildung 3.1: Versuchsreihe 1: 15- minütige Vorbehandlung des Trägers mit 70%-igem Ethanol, das Kollagengerüst erscheint ausgedünnt und skelettiert, es findet sich kaum Zellmaterial in der Übersichtsaufnahme. Färbung: AB, Vergr. 2fach.

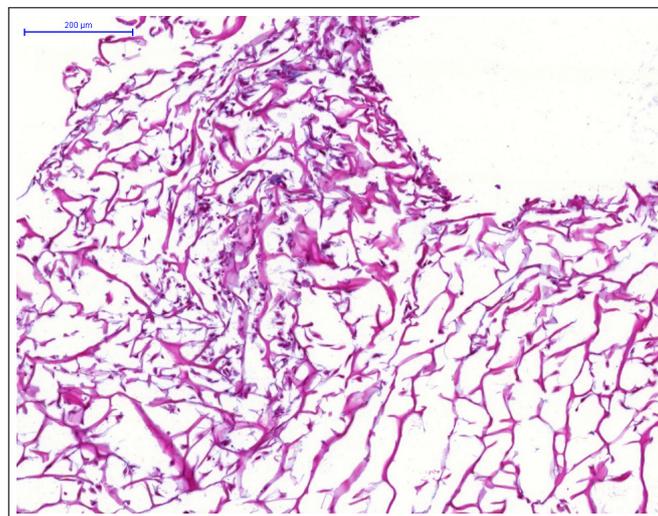


Abbildung 3.2: Versuchsreihe 1: der vergrößerte Bildausschnitt aus 3.1 lässt nur wenig spindelförmige Zellen erkennen. Färbung: AB, Vergr. 10fach

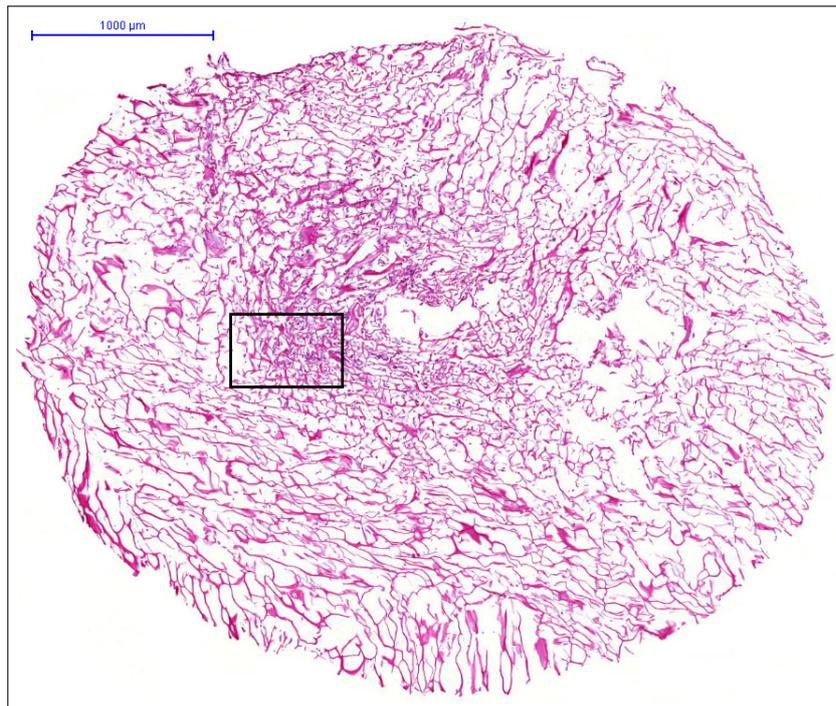


Abbildung 3.3: Versuchsreihe 1: Einbringen der Chondrozyten in das Konstrukt mittels Kanüle, die Zellen scheinen sich nur um den Stichkanal zu konzentrieren. Färbung: AB, Vergr. 2fach

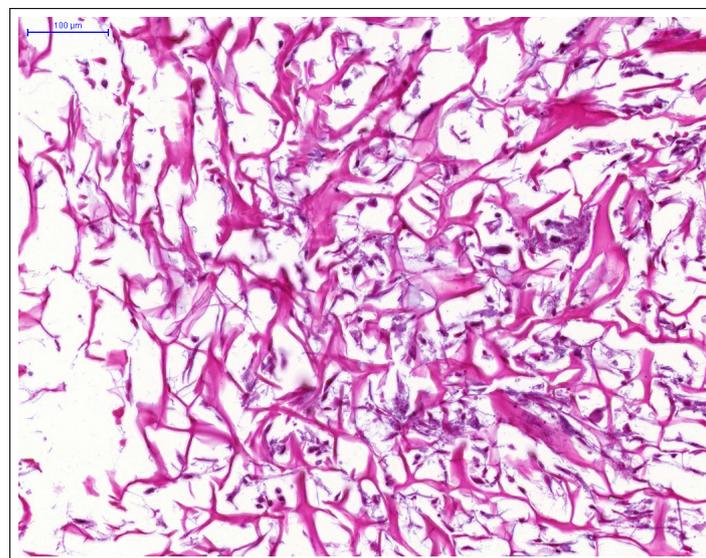


Abbildung 3.4: Versuchsreihe 1: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.3. Zwischen den Kollagenbälkchen finden sich nur wenige, spindelförmige Zellen. Färbung: AB, Vergr. 15fach

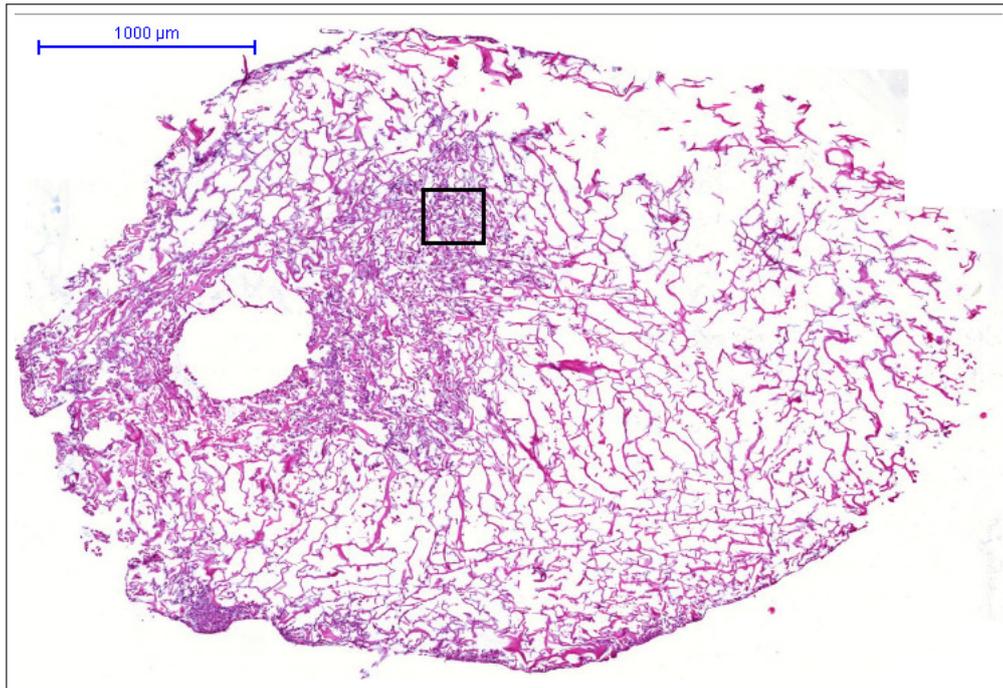


Abbildung 3.5: Versuchsreihe 1: Einbringen der Chondrozyten in das Konstrukt mittels Kapillarwirkung. Die Zellen konzentrieren sich um einen Hohlraum inmitten des Konstruktes. Die Zellen durchdringen die Trägermatrix nur mäßig. Färbung: AB, Vergr. 2fach

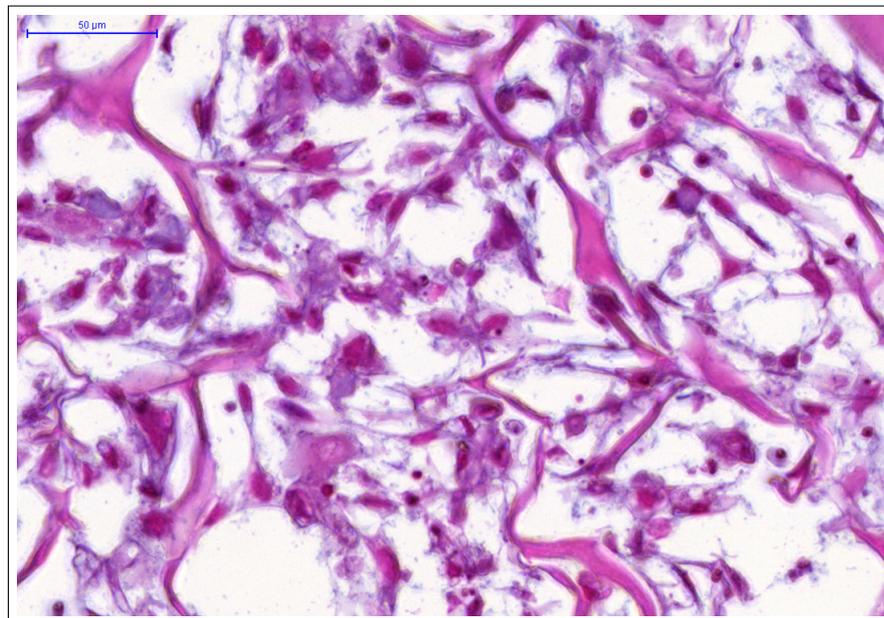


Abbildung 3.6: Versuchsreihe 1: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.5. Die Zellen sind von wenig EZM umgeben. Färbung: AB, Vergr. 40fach

3.4.2 Versuchsreihe 2

3.4.2.1 Histologie

Die histologischen Schnitte der beimpften Konstrukte nach Woche drei sind auf den Abbildungen 3.7 bis 3.14 dargestellt. Die AB- Färbung des mit einer halben Million Knorpelzellen beimpften Konstruktes zeigt in der Übersichtsaufnahme (siehe Abbildung 3.7) eine relativ homogene Durchsiedelung des Konstruktes mit Zellen. An einigen Randbereichen finden sich, wie in den Vorversuchen schon beschrieben, Ballungsregionen der Zellen. In der 20fachen Vergrößerung (Abbildung 3.8) können zwischen den Kollagenbälkchen kugelige Zellen mit großem Zellkern beschrieben werden, die von einer zartblauen Extrazellulärsubstanz umgeben werden. Die blaue Farbe entspricht in dieser Färbung dem Nachweis von sauren Mucinen wie GAG. Die SO- Färbung auf den Abbildungen 3.9 und 3.10 stellen die mit einer Million Zellen besiedelten Konstrukte dar. Die Oberfläche des Trägers ist mit rot angefärbten, rundlichen Zellen bedeckt, die von einer hellrosa Matrix umgeben sind. Tiefer in den Kollagenbalken finden sich spindelförmige Zellstrukturen. Ein ähnliches Bild findet sich auf den Abbildungen (3.11 und 3.12) der mit zwei Millionen Zellen beimpften Matrices. Oberflächlich finden sich rot eingefärbte, runde Zellmorphologien, die jedoch nicht in die Tiefe des Trägers vordringen. Die Aufnahmen 3.13 und 3.14 der mit drei Millionen Zellen besiedelten Konstrukte zeigen einen schmalen Randsaum knorpelähnlicher Zellen. Innerhalb des Konstruktes sind wiederum spindelförmige, schmale Zellformen zu erkennen.

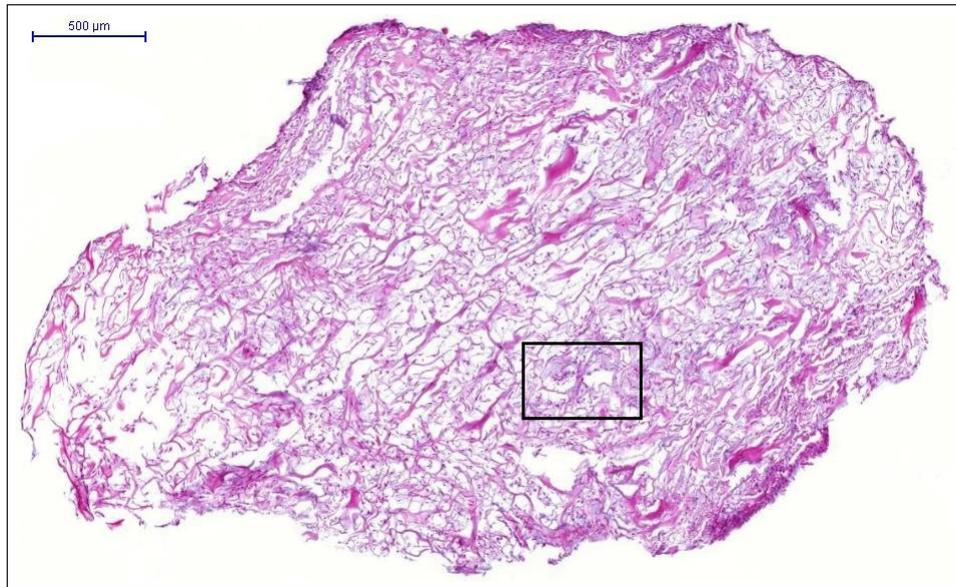


Abbildung 3.7: Versuchsreihe 2: Konstrukt drei Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen, Färbung: AB, Vergr. 3fach

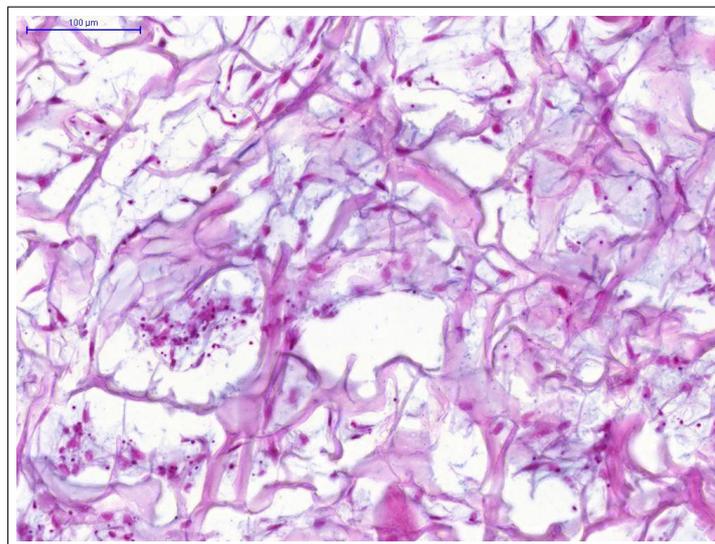


Abbildung 3.8: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.7. Die Zellen sind von mucinreicher extrazellulärer Matrix umgeben. Färbung: AB, Vergr. 20fach

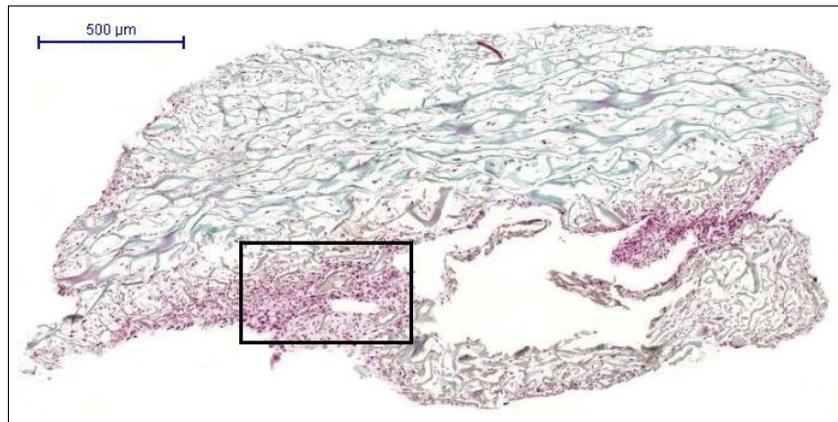


Abbildung 3.9: Versuchsreihe 2: Konstrukt drei Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen. Die Zellen liegen gruppiert umgeben von hellrosa extrazellulärer Matrix und lagern sich auch zwischen den Kollagenbälkchen des Trägers ab. Färbung: SO, Vergr. 3fach

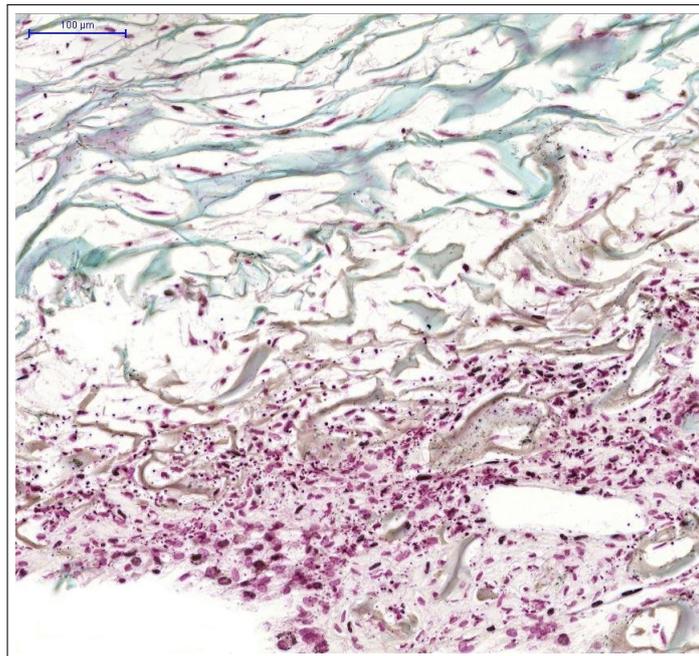


Abbildung 3.10: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.9. Die Zellen liegen dicht gedrängt an Randbereichen des Zellträgers und vereinzelt in peripheren Anteilen des Konstrukts. Färbung: SO, Vergr. 15fach

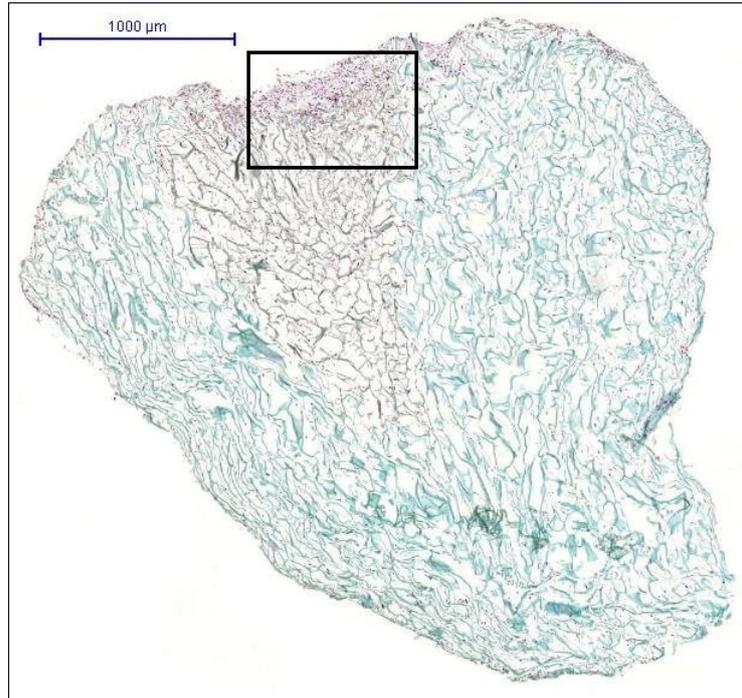


Abbildung 3.11: Versuchsreihe 2: Konstrukt drei Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen. Die aufgebrauchten Zellen liegen eng gedrängt an der Trägeroberfläche und dringen nicht in die Tiefe der Trägermatrix vor. Färbung: SO, Vergr. 2fach

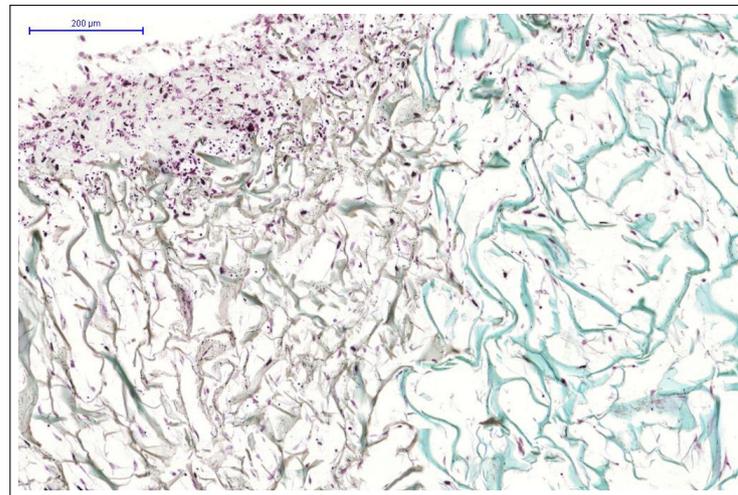


Abbildung 3.12: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.11. Es finden sich an der Trägeroberfläche runde Zellen umgeben von blassrosa EZM. Färbung: SO, Vergr. 20fach

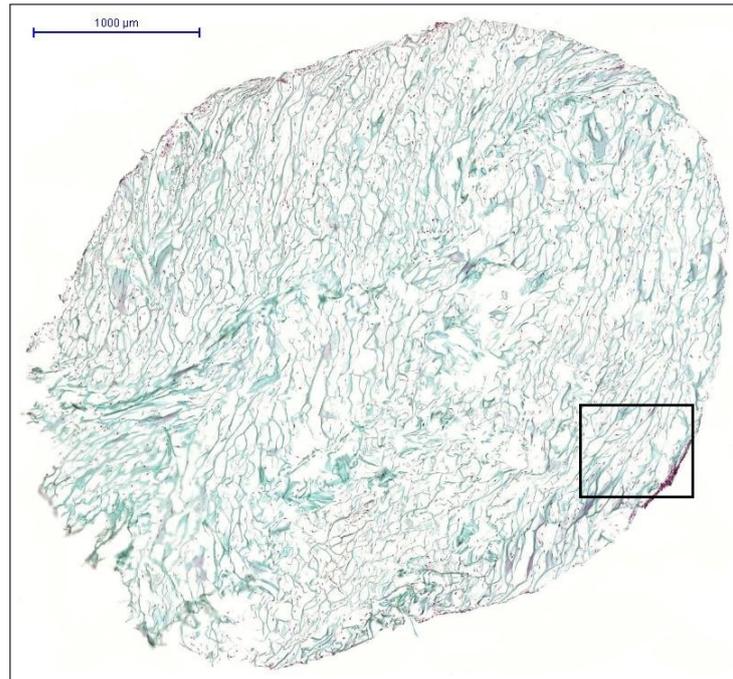


Abbildung 3.13: Versuchsreihe 2: Konstrukt drei Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen. Zwischen den Kollagenbalken des Trägers ist kaum Zellmaterial zu finden. Färbung: SO, Vergr. 2fach

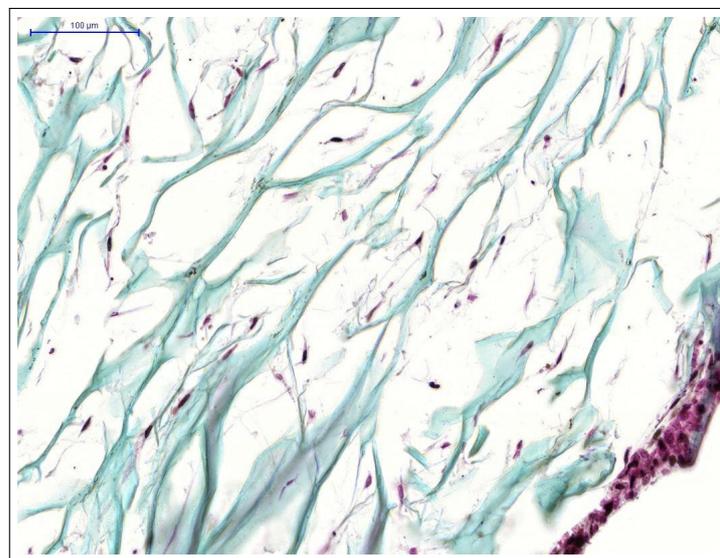


Abbildung 3.14: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.13. In der Vergrößerung ist ein schmaler Randsaum dicht gedrängt liegender Zellen zu erkennen. Innerhalb des Konstruktes finden sich nur wenige fibroblastenähnliche Zellen. Färbung: SO, Vergr. 20fach

Fünf Wochen nach der Beimpfung mit einer halben Million Chondrozyten zeigt die AB- Färbung in Abbildung 3.15 eine weitgehend einheitliche Verteilung der Zellen im Gitternetz des Trägermaterials. In der 40fachen Vergrößerung (Abbildung 3.16) haben sich die Zellen innerhalb des Trägergitters eingemischt. Die blassblauen Strukturen um die Zellkörper lassen auf eine GAG- Synthese der Zellen schließen. Auch die Besiedelung mit einer Million Zellen bewirkt eine durchgehende Ansiedelung der Zellen im Konstrukt (Abbildung 3.17). Die Detailaufnahme (Abbildung 3.18, 40fache Vergrößerung) lässt rötlich- violette, kugelige Zellen mit rundovalem Zellkern erkennen. Ebenfalls homogen besiedelt ist die mit zwei Millionen Zellen beimpfte Trägermatrix (Abbildung 3.19). Gut zu erkennen ist die durch die AB- Färbung leuchtend blau angefärbte Ecke des Konstruktes. In der Nahaufnahme (Abbildung 3.20) sind kugelige Zellen mit großem Zellkern sichtbar, die sich chondronartig zusammenlagern und von tiefblauer Matrix umgeben sind. Die Ansiedelung von drei Millionen Zellen zeigt eine mäßig erfolgreiche Durchdringung des Konstruktes mit Zellen (Abbildung 3.21). Auch an den Randbereichen lagern sich nur wenige rötlich angefärbte Zellen an. Auch die 20fache Vergrößerung kann nur stark differenzierte, sehr schmale und lang gezogene Zellen mit teilweise kaum erkennbaren Zellkernen zeigen.

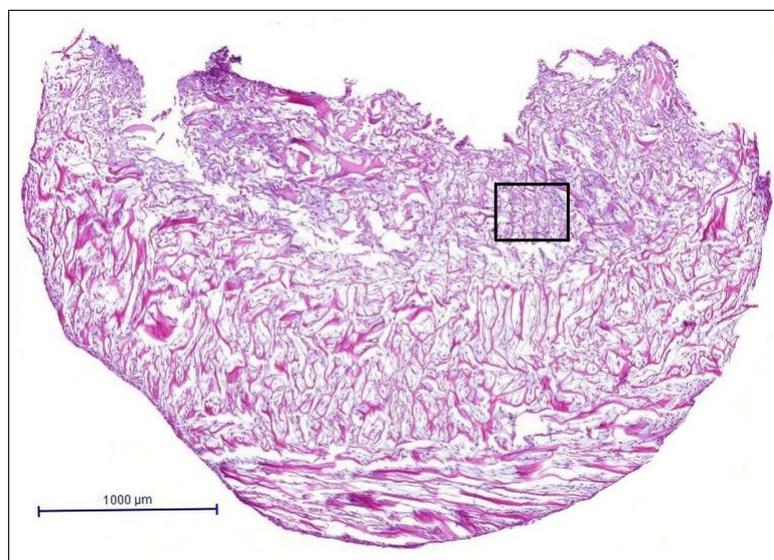


Abbildung 3.15: Versuchsreihe 2: Konstrukt fünf Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen. Die Zellen liegen relativ homogen verteilt im Trägerkonstrukt. Färbung: AB, Vergr. 2fach

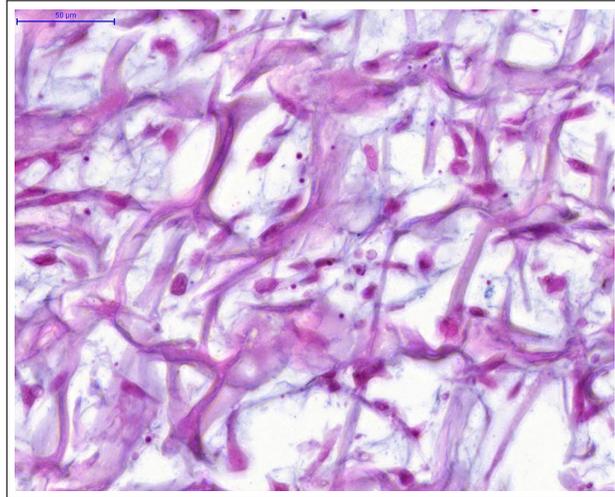


Abbildung 3.16: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.15. Die Zellen enthalten einen rosa Zellkern und sind von zartblauer, mucinhaltiger EZM umgeben. Färbung: AB, Vergr. 40fach

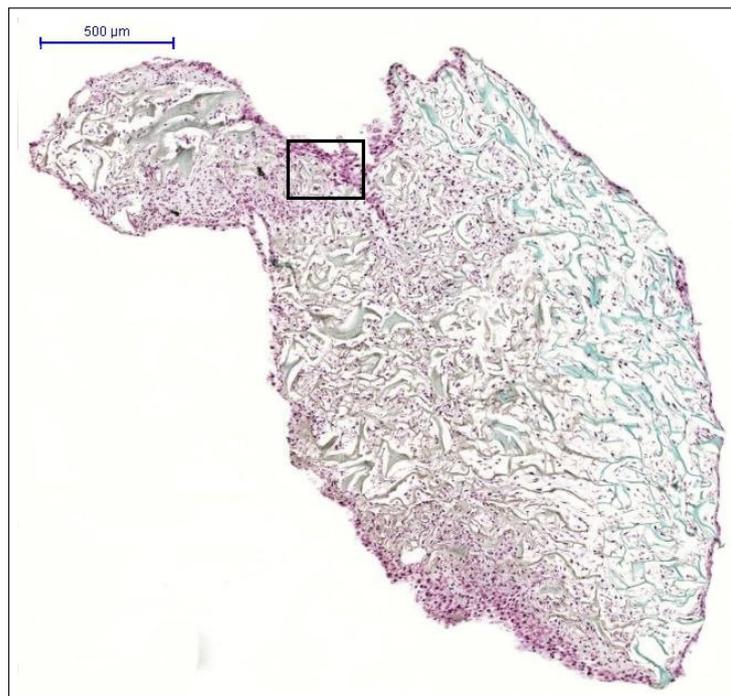


Abbildung 3.17: Versuchsreihe 2: Konstrukt fünf Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen. Das Konstrukt ist homogen mit Zellen besiedelt. An den Randbereichen spricht die rot-violette Färbung für die Synthese proteoglykanreicher Matrix. Färbung: SO, Vergr. 3fach

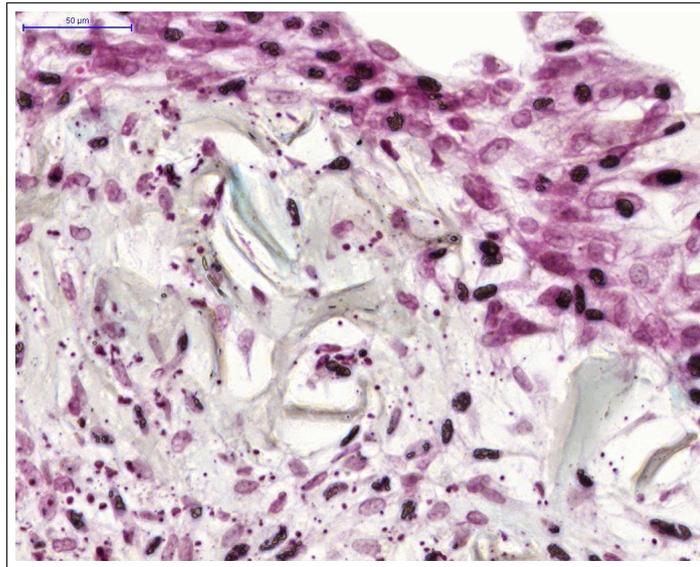


Abbildung 3.18: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.17. Hier zeigen die Zellen an dem Randbereich des Trägers teilweise einen chondrozyten-ähnlichen Phänotyp, welcher sich in Richtung tieferer Schichten jedoch verliert. Färbung: SO, Vergr. 20fach

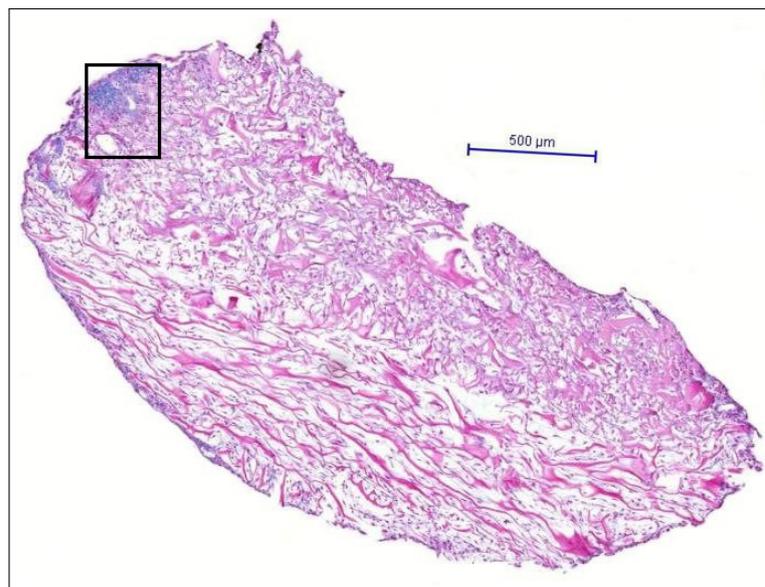


Abbildung 3.19: Versuchsreihe 2: Konstrukt fünf Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen. Erneut gibt es an den Randbereichen des Konstrukts Ballungsregionen der Zellen. Hier ist auf der Übersichtsaufnahme an wenigen Regionen eine tiefblau gefärbte Zellformation zu erkennen. Das Konstrukt erscheint homogen von Zellen durchdrungen. Färbung: AB, Vergr. 3fach

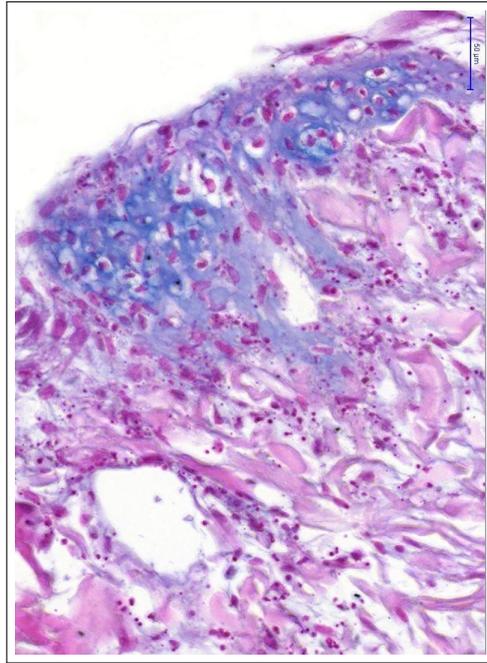


Abbildung 3.20: Versuchsreihe 4: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.19. Der Ausschnitt zeigt eine Zellansammlung chondrozytenähnlicher Zellen, die von blau angefärbter Matrix umgeben sind. Färbung: AB, Vergr. 30fach

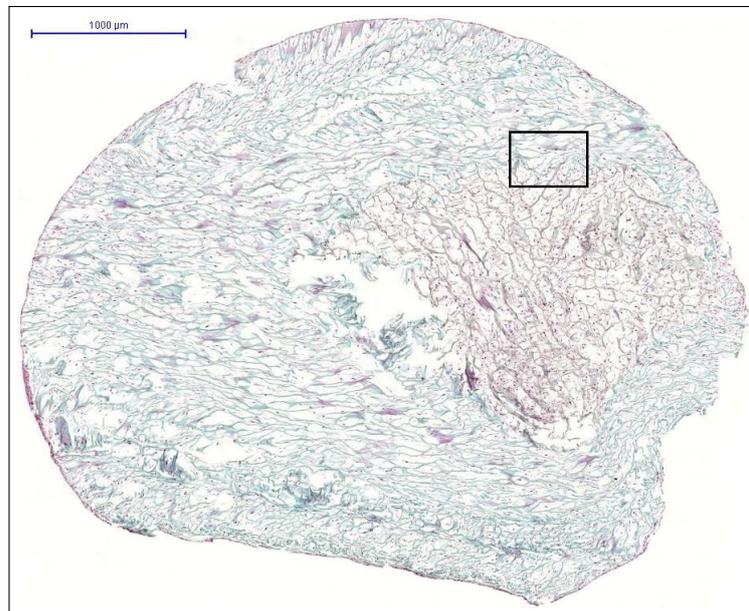


Abbildung 3.21: Versuchsreihe 2: Konstrukt fünf Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen. Das Konstrukt ist nur mäßig von Zellen durchdrungen. Färbung: SO, Vergr. 2fach

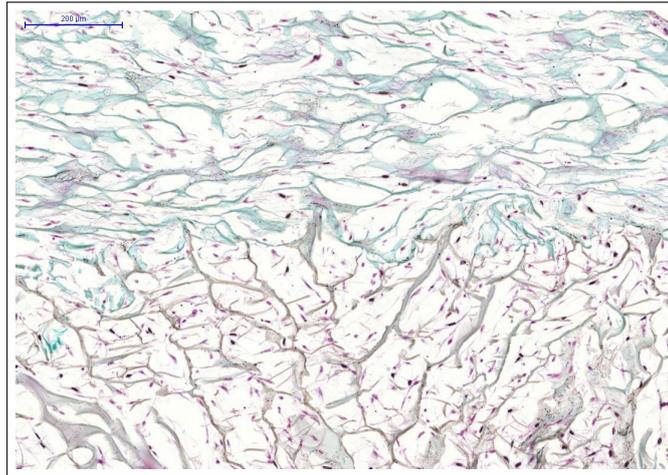


Abbildung 3.22: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.21. Die sichtbaren Zellen haben sich vereinzelt zwischen den Konstruktstäbchen angesiedelt. Sie zeigen einen spindelförmigen Phänotyp. Färbung: SO, Vergr. 20fach

Sieben Wochen nach Ansiedelung von einer halben Million Knorpelzellen zeigt die SO- Färbung der Abbildung 3.23 eine mäßig homogene Besiedelung des Konstruktes mit Zellen. An den Randbereichen des Trägers können abschnittsweise Anhäufungen von rötlich angefärbten Zellen gezeigt werden. In der Trägermatrix sind nur vereinzelt schmale Zellkörper sichtbar. Die 20fache Vergrößerung (Abbildung 3.24) lässt am Rand zwar einige knorpelähnliche Zellen erkennen, in der Matrix befinden sich jedoch nur stark degenerierte, stäbchenförmige Zellkörper. Die Besiedelung mit einer Million Zellen (Abbildung 3.25) zeigt wiederum eine bessere zelluläre Durchsiedelung des Konstruktes. Auch ist eine zartblaue Kolorierung durch die AB- Färbung um die Zellen erkennbar. In der Nahaufnahme erscheinen die Zellen schmal mit langgezogenem Zellkern (Abbildung 3.26). Nach der Ansiedelung von zwei Millionen Zellen zeigt sich eine starke Anhäufung der Zellen im Randbereich (Abbildung 3.27). Die Zellen des Randbereichs färben sich in der SO- Färbung violett an und weisen einen runden bis länglichen Zellkörper mit großem Zellkern auf (siehe 20fache Vergrößerung 3.28). Diese Zellen sind jedoch nur auf der Oberfläche des Trägers aufgelagert und dringen nicht in das Gitterwerk des Konstruktes ein. Die Besiedelung mit drei Millionen Zellen zeigt in der Übersichtsaufnahme 3.29 an manchen Randbezirken in der AB- Färbung bläulich angefärbte Zellansammlungen und eine relativ homogene zelluläre

Durchdringung. Innerhalb des Konstruktes finden sich jedoch nur verzweigte, langgezogene Zellen (Abbildung 3.30).

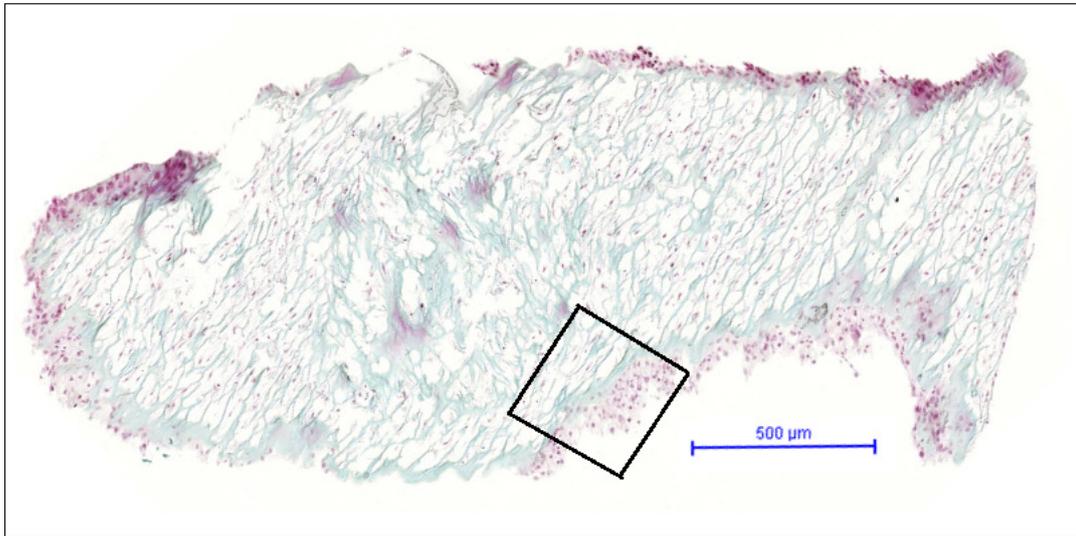


Abbildung 3.23: Versuchsreihe 2: Konstrukt sieben Wochen nach Beimpfung mit einer halben Million Zellen. An den Randbereichen des Konstrukts finden sich Zellanhäufungen mit rosa angefärbten Zellen. In die Tiefe des Trägers sind jedoch nur wenige Zellen vorgedrungen. Färbung: SO, Vergr. 3fach

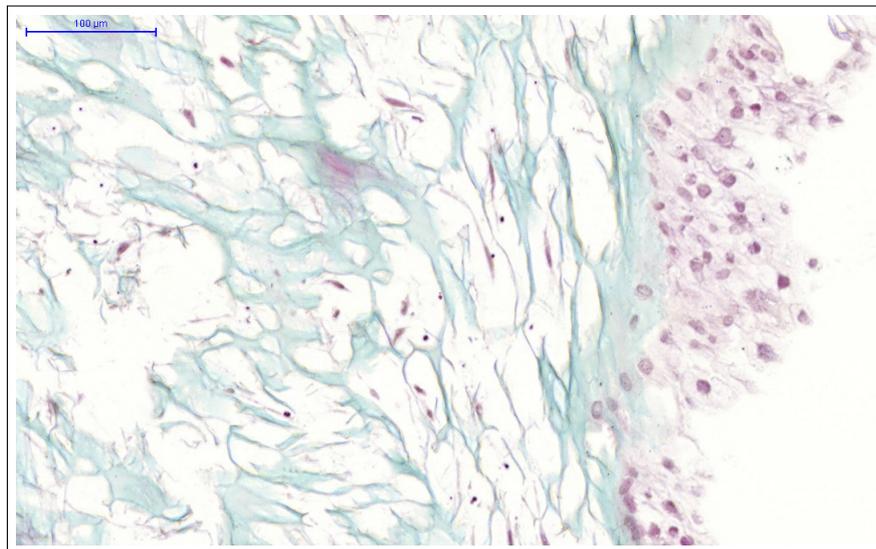


Abbildung 3.24: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.23. Die Zellen an der Konstruktoberfläche zeigen einen rundlichen Phänotyp mit zentral gelegenem Zellkern. Zwischen den Kollagenbalken finden sich nur wenige längliche Zellen. Färbung: SO, Vergr. 20fach

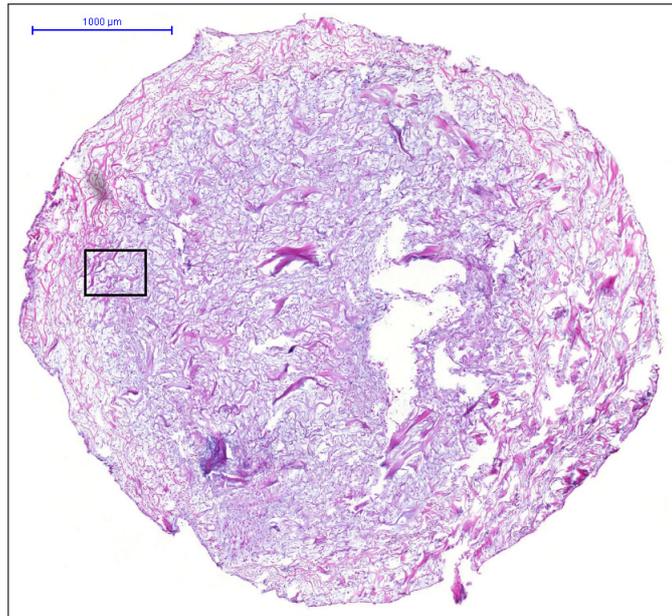


Abbildung 3.25: Versuchsreihe 2: Konstrukt sieben Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen. Das Konstrukt scheint homogen mit Zellen besiedelt zu sein. Färbung: AB, Vergr. 2fach

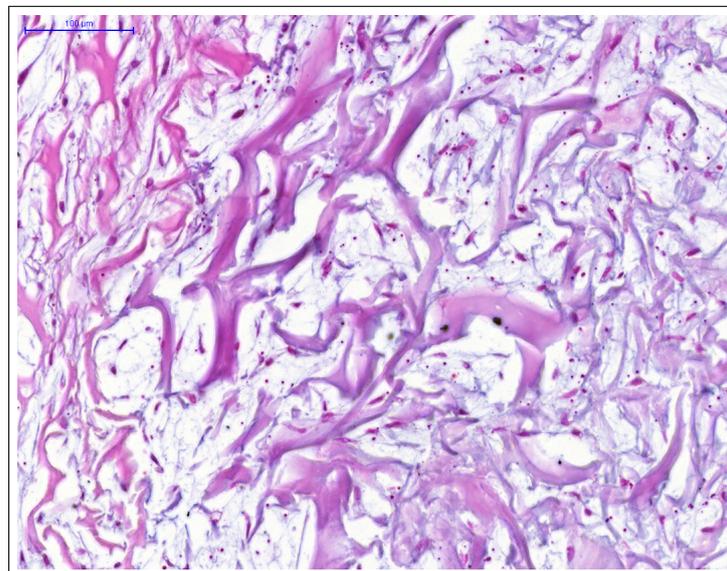


Abbildung 3.26: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.25. Zwischen den Kollagenbalken der Trägermatrix finden sich schmale, langgezogene Zellen, umgeben von zartblauen Matrixschleiern. Färbung: AB, Vergr. 20fach

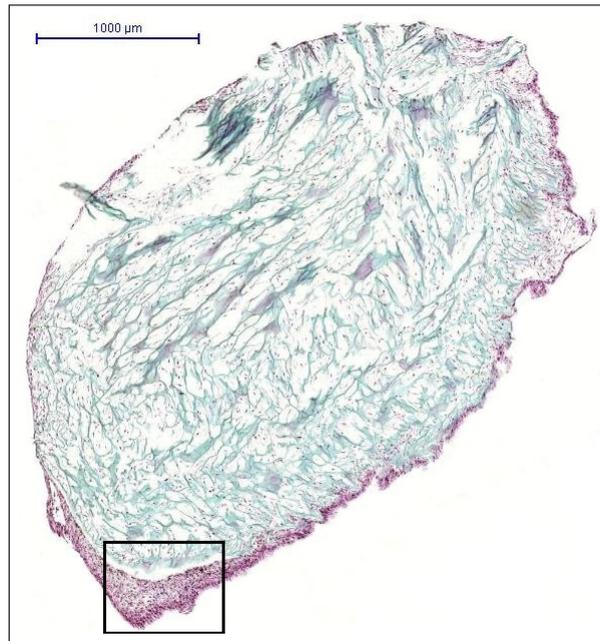


Abbildung 3.27: Versuchsreihe 2: Konstrukt sieben Wochen nach Beimpfung mit zwei Millionen Zellen. Die rot-violett angefärbten Zellen häufen sich erneut am Randbereich des Trägers an. Im Konstrukt selbst siedeln sich nur dedifferenzierte, fibroblastenähnliche Zellen an. Färbung: SO, Vergr. 2fach

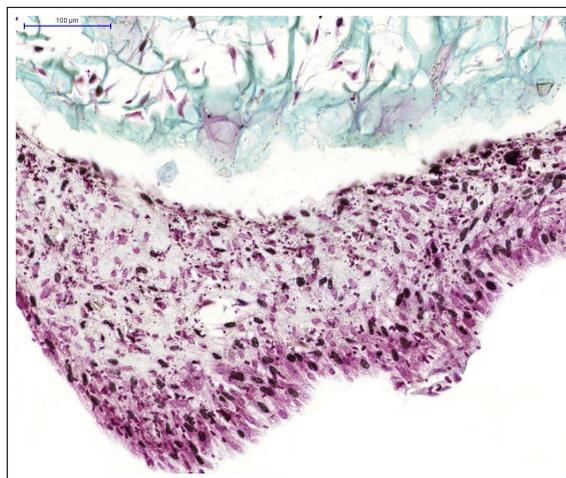


Abbildung 3.28: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.27. Die Zellen liegen in einem Zellhaufen am Konstruktrand, dort scheint auch EZM synthetisiert zu werden. Die Zellen erscheinen dedifferenziert. Färbung: SO, Vergr. 20fach

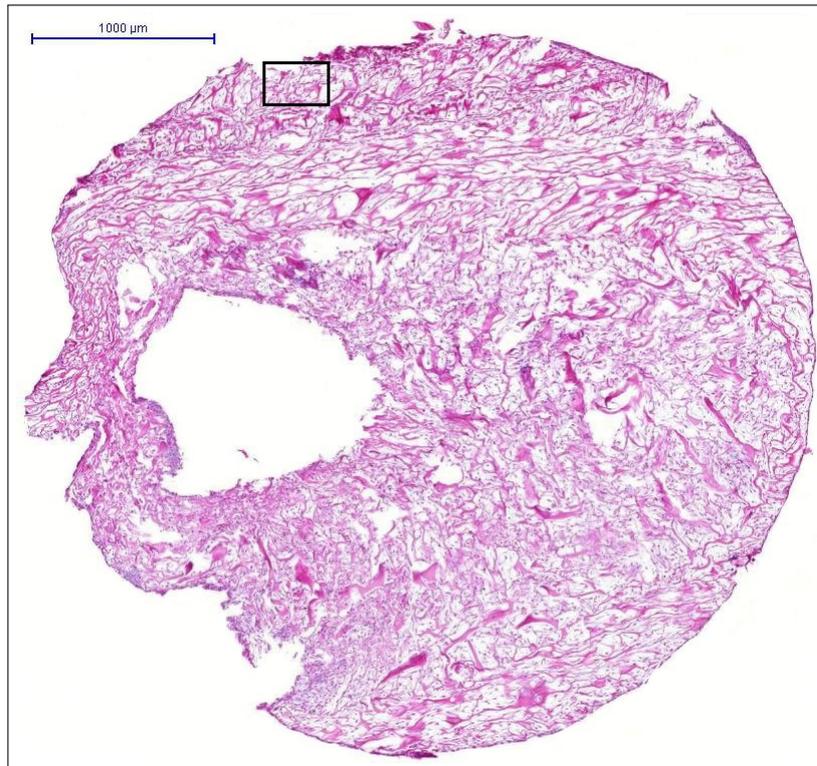


Abbildung 3.29: Versuchsreihe 2: Konstrukt sieben Wochen nach Beimpfung mit drei Millionen Zellen. In der übersichtsaufnahme sind nur an Randbezirken vereinzelt Zellen zu erkennen. Färbung: AB, Vergr. 2fach

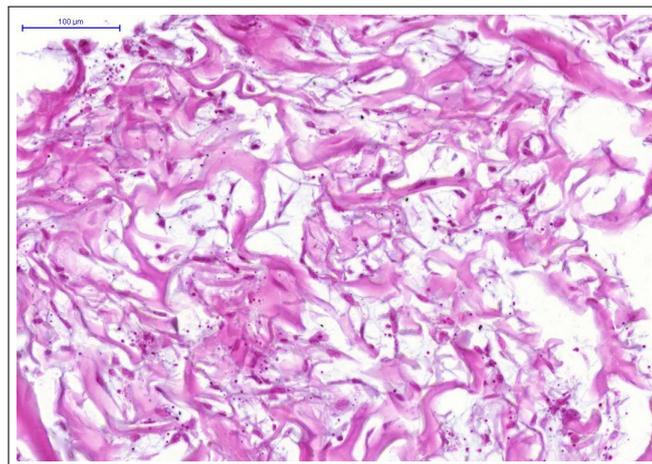


Abbildung 3.30: Versuchsreihe 2: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.29. Zu sehen sind einzelne, dedifferenzierte Zellen zwischen den Balken des Trägergerüsts. Färbung: AB, Vergr. 20fach

3.4.2.2 Biochemische Auswertung

Die Grafik 3.31 stellt die zeitabhängige Veränderung des DNA- Gehalts nach Beimpfung des Konstruktes mit unterschiedlichen Zellzahlen (eine halbe, eine, zwei und drei Millionen) dar.

Die Besiedelung mit einer halben Million Knorpelzellen zeigt im Zeitverlauf über drei bis sieben Wochen einen stabilen Verlauf des DNA- Gehalts. Die Werte steigen von initial 39,3 ng/ml in Woche fünf auf 46,5 ng/ml in Woche sieben.

Zwischen drei und fünf Wochen nach der Anzüchtung von einer Million Zellen kann ein wesentlicher Anstieg von 41,26 ng/ml auf 47,81 ng/ml und nach sieben Wochen eine Abnahme auf 46,53 ng/ml festgestellt werden. Der zeitliche Verlauf nach der Beimpfung mit zwei Millionen Zellen zeigt einen konstanten Gehalt an DNA und variiert nur unwesentlich zwischen initial 58,57 ng/ml nach drei Wochen und 50,4 ng/ml nach sieben Wochen. Ebenso verhält es sich mit dem DNA- Gehalt des mit drei Millionen Zellen beimpften Trägers.

Abbildung 3.32 beschreibt die zeitabhängige Veränderung des GAG- Gehalts nach der Ansiedelung von einer halben, einer, zwei oder drei Million(en) Knorpelzellen. Nach der Besiedelung mit einer halben Million Zellen kann eine gewichtige Zunahme des GAG- Gehalts zwischen drei und fünf Wochen von 13,48 ng/ml auf 21,05 ng/ml und bis Woche sieben ein nicht gewichtiger Abfall auf 18,14 ng/ml verzeichnet werden. Die mit einer Million Zellen besiedelten Konstrukte zeigen zwischen Woche drei und fünf eine deutliche Zunahme des GAG- Gehalts von 10,41 ng/ml auf 20,77 ng/ml und einen ebenfalls deutlichen Abfall auf 15,73 ng/ml in der siebten Woche. Nach der Ansiedelung von zwei Millionen Zellen kann zwischen drei und fünf Wochen ein relevanter Anstieg der GAG- Konzentration von 10,55 ng/ml auf 22,61 ng/ml und ein nicht wesentlicher Abfall auf 20,91 ng/ml beobachtet werden. Die Beimpfung mit drei Millionen Zellen schließlich zeigt zwischen Woche drei und fünf einen starken Abfall des GAG- Gehalts von 29,42 ng/ml auf 17,36 ng/ml und bis Woche sieben mit 17,93 ng/ml keine relevante Konzentrationsänderung.

Der Vergleich zwischen der Veränderung des DNA- Gehalts und der Veränderung des GAG- Gehalts zeigt eine über die Wochen relativ konstante DNA- Konzentration bei deutlichen Schwankungen des GAG- Gehalts in den ersten fünf Wochen nach Besiedelung.

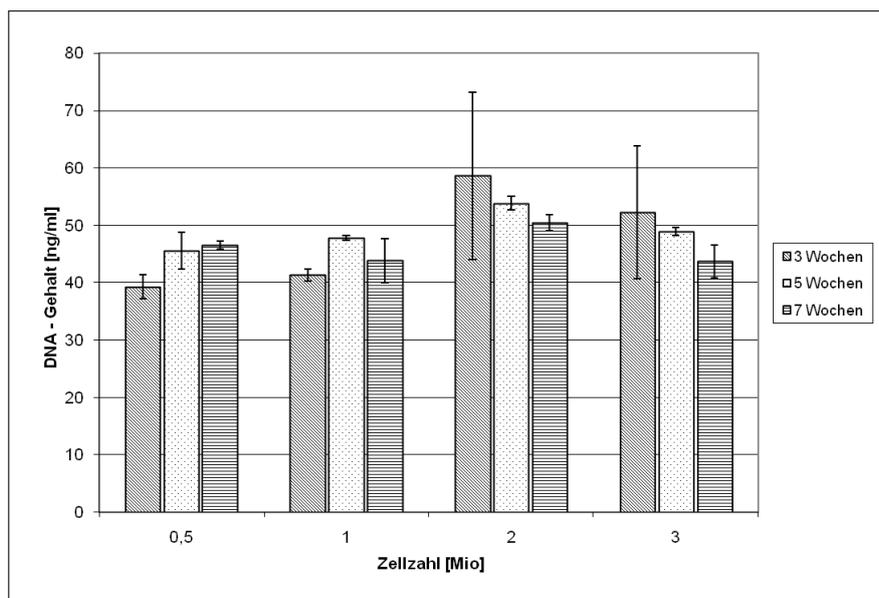


Abbildung 3.31: Versuchsreihe 2: zeitabhängige Veränderung des DNA- Gehalts über 3, 5 und 7 Wochen nach Beimpfung mit 0,5, 1, 2 oder 3 Millionen Chondrozyten

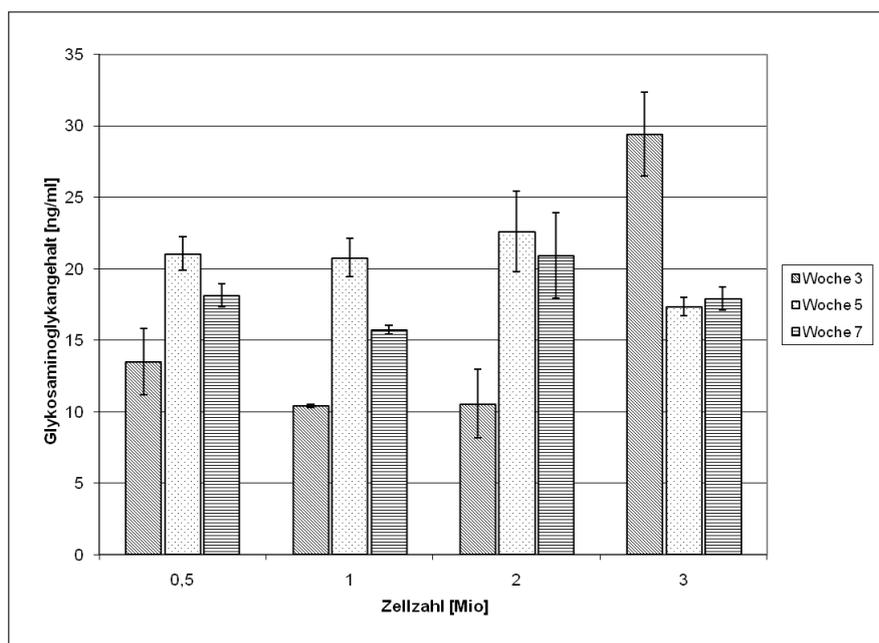


Abbildung 3.32: Versuchsreihe 2: zeitabhängige Veränderung des Glykosaminoglykan- Gehalts über 3, 5 und 7 Wochen nach Beimpfung mit 0,5, 1, 2 oder 3 Millionen Chondrozyten

3.4.3 Versuchsreihe 3

3.4.3.1 Histologie

Die HE-Färbung des Konstruktes nach Beimpfung mit einer Million Chondrozyten zeigt in der Übersichtsaufnahme einen sich am Rand des Trägermaterials konzentrierenden Zellrasen (siehe 3.33). Zwischen den Kollagenbalken sind einzelne langgezogene Zellen mit sehr schmalen Zellkern erkennbar. In der 10fachen Vergrößerung (Abbildung 3.34) sind die Randzellen schwer voneinander zu differenzieren, sie liegen dicht gedrängt aneinander und überlagern sich gegenseitig.

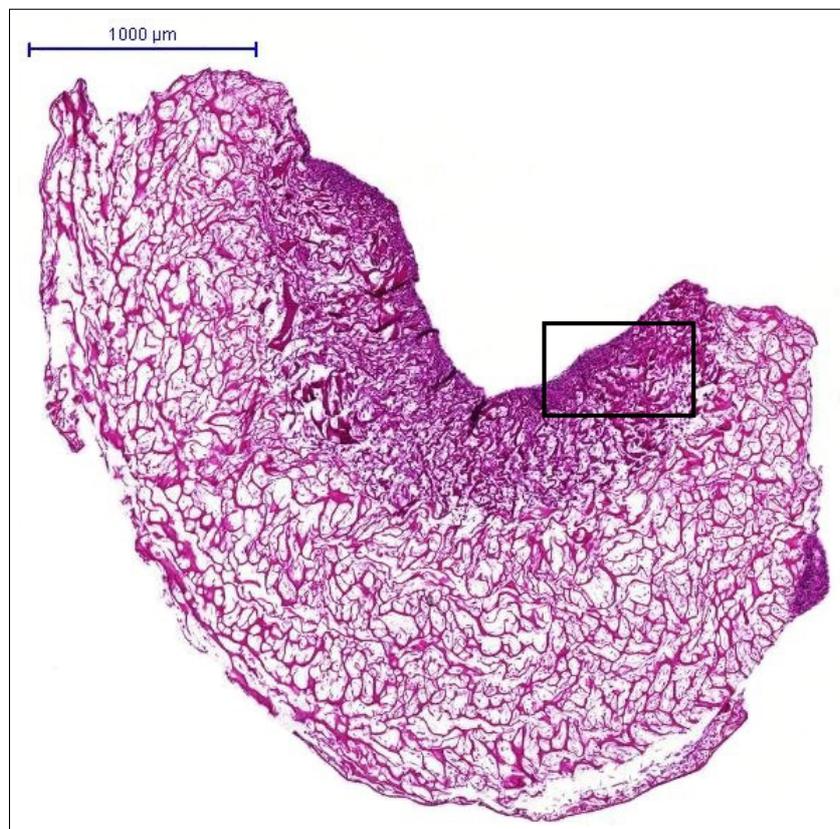


Abbildung 3.33: Versuchsreihe 3: Aufnahme des Konstruktes ca. drei Wochen nach Beimpfung mit einer Million Zellen. An der Oberfläche der Trägermatrix lagern sich die Zellen zu einem Zellrasen zusammen. Innerhalb des Konstruktes haben sich nur wenige fibroblastenähnlichen Zellen angesiedelt. Färbung: HE, Vergr. 2fach

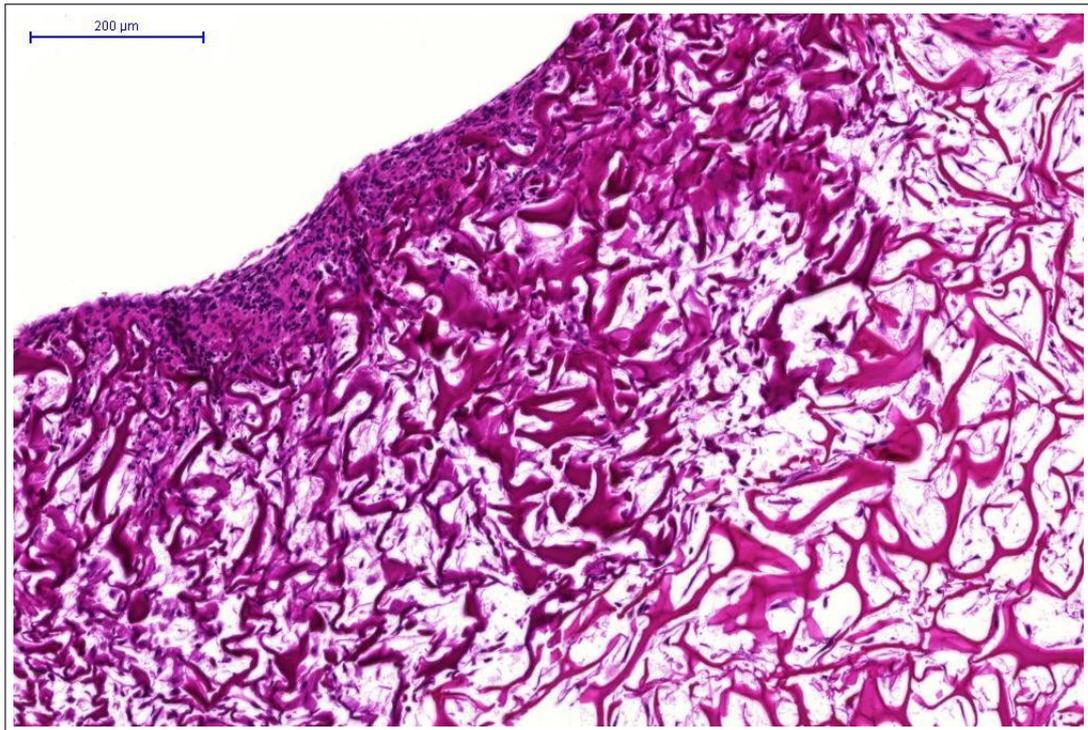


Abbildung 3.34: Versuchsreihe 3: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.33. Der Zellrasen besteht aus dicht gedrängten fibroblastenartigen Zellen, die nur mäßig bis in das Innere des Trägers eindringen. Färbung: HE, Vergr. 10fach

Die Abbildung 3.35 zeigt die Trägermatrix nach Anzüchtung mit zwei Millionen Knorpelzellen. Hier kann wieder die dichte Anhäufung der aufgeimpften Zellen am Randbereich des Trägers beobachtet werden. In die Tiefe des Konstruktes sind nur vereinzelt Zellen vorgedrungen. Die 20fache Vergrößerung (Abbildung 3.36) lässt in der Zellansammlung teilweise knorpelähnliche Zellen mit rundem Zellkern und blassrosa Zellkörper erkennen.

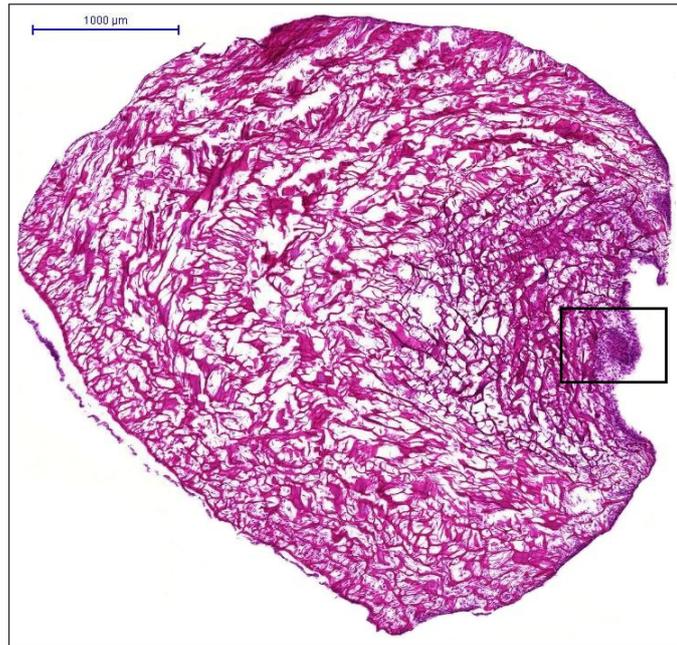


Abbildung 3.35: Versuchsreihe 3: Aufnahme des Konstruktes ca. drei Wochen nach Beimpfung mit zwei Million Zellen. Die Zellen konzentrieren sich an der Trägeroberfläche und lagern sich zu einem Zellhaufen zusammen. Färbung: HE, Vergr. 2fach

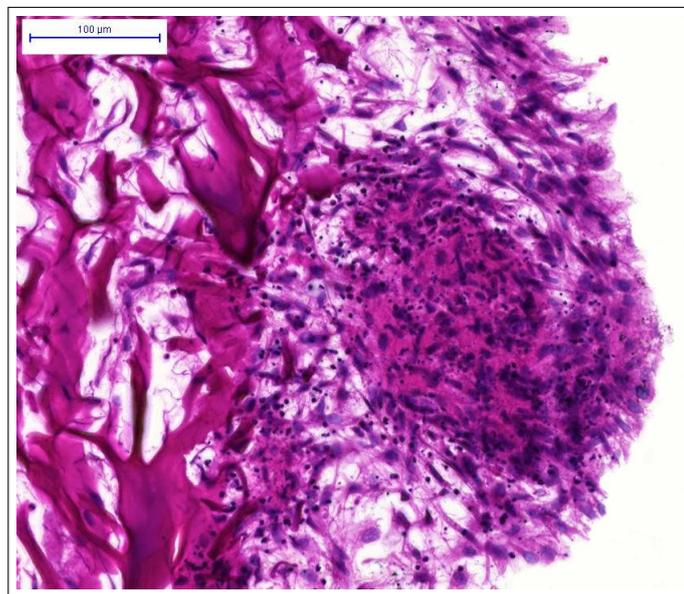


Abbildung 3.36: Versuchsreihe 3: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.35. Die Zellansammlung lässt schmale Zellen mit spindelförmigen Ausläufern erkennen. Färbung: HE, Vergr. 20fach

Die Beimpfung mit drei Millionen Zellen zeigt eine gute Durchdringung des Trägers mit Knorpelzellen, was auf der SO-Färbung in Abbildung 3.37 zu erkennen ist. Zwar finden sich die meisten Zellen nach wie vor am Randbereich des Konstruktes, das Zellinnere enthält jedoch einige Zellen, die sich in der SO-Färbung rot anfärben lassen. Abbildung 3.38 zeigt die 20fache Vergrößerung des Randbereichs. Hier liegen knorpelähnliche Zellen mit rundem, polygonalen Korpus und rundem Zellkern zwischen spindelförmigen Zellen mit ovalem Kern.

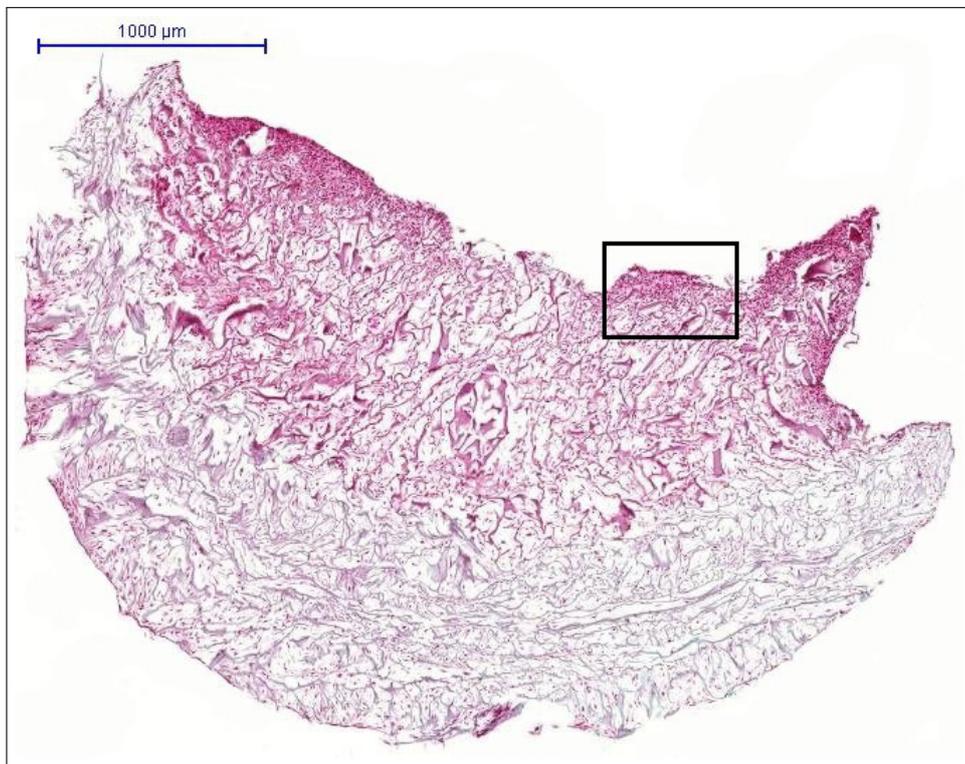


Abbildung 3.37: Versuchsreihe 3: Aufnahme des Konstruktes ca. drei Wochen nach Beimpfung mit drei Million Zellen. Die Oberfläche der Trägermatrix ist homogen mit Zellen besiedelt, wobei sich die größte Zellansammlung erneut an der Oberfläche findet. Färbung: SO, Vergr. 2fach

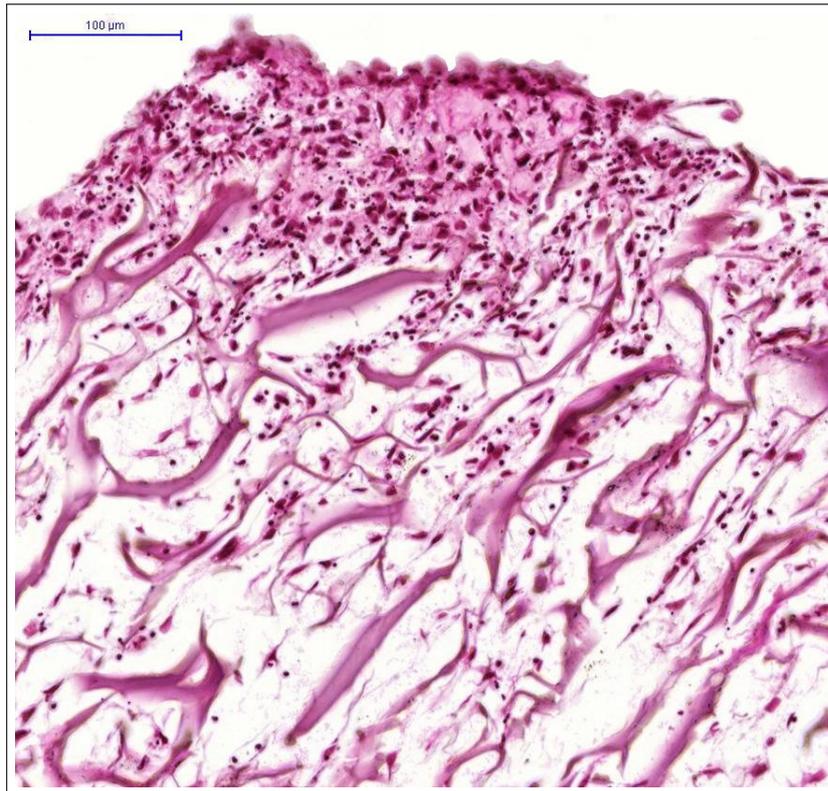


Abbildung 3.38: Versuchsreihe 3: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.37. Der Randbereich des Trägers ist dicht mit Zellen besiedelt, die von proteoglykanreicher Matrix umgeben sind. Innerhalb des Kollagengitters siedeln sich jedoch nur vereinzelt dedifferenzierte Zellen an. Färbung: SO, Vergr. 20fach

3.4.4 Versuchsreihe 4

3.4.4.1 Histologie

Histologisch kann bei den Konstrukten, die drei Wochen nach Beimpfung mit einer Million Chondrozyten eingebettet und gefärbt wurden, eine oberflächliche Aufnahme der Knorpelzellen in das Trägermaterial gezeigt werden (siehe Abbildungen 3.39 und 3.40). Die Zellen weisen meist eine längliche Morphologie mit rund-ovalem bis spindelförmigem Zellkern auf und sind vor allem in der Peripherie der Trägermatrix angesiedelt. Die mit Zellen besiedelten Kollagenbälkchen des Konstruktes sind rot angefärbt, was auf einen erhöhten Proteoglykangehalt und somit auf Synthese von EZM schließen lässt.

Fünf Wochen nach der Beimpfung kann ebenfalls eine Anhäufung der Zellen an den Randbereichen um einen zentralen Hohlraum in dem Trägermaterial beobachtet werden (siehe Abbildungen 3.41 und 3.42). Die Zellen sind im Gitternetz der Matrix angesiedelt und imponieren durch einen im Vergleich zu den Zellen aus Woche drei größeren und runderen Zellkern.

Eine fortschreitende Dedifferenzierung ist in Woche sieben sichtbar (siehe Abbildungen 3.43 und 3.44). Rundliche, chondrozytenähnliche Zellen sind nur um Hohlräume im Konstrukt erkennbar. Zwischen den Balken der Trägermatrix liegen spindelförmige Zellen mit sehr schmalen Zellkern, die sich zwar in der SO-Färbung noch rötlich anfärben lassen, morphologisch jedoch keine Ähnlichkeit mit Chondrozyten aufweisen.

3.4.4.2 Biochemische Auswertung

Die graphische Darstellung 3.45 des DNA- Assays nach Hoechst stellt die zeitabhängige Veränderung des DNA- Gehalts über drei, fünf und sieben Wochen dar. Verglichen wurden die Nasenknorpelbiopsate zweier Patienten. Nach einem zwischen drei und fünf Wochen nach Ansiedelung der Knorpelzellen zunächst nicht bedeutsamen Abfall des DNA- Gehalts von 32,63 ng/ml auf 31,01 ng/ml zeigt sich bei Patient 1 zwischen fünf und sieben Wochen ein deutlicher Anstieg des DNA- Gehalts von 31,01 ng/ml auf 37,76 ng/ml.

Der DMMB- Assay zum Nachweis von GAG (Abbildung 3.46) weist bei Patient 1 zwischen drei und fünf Wochen nach Ansiedelung der Knorpelzellen einen relevanten Abfall des GAG- Gehalts von 22,57 ng/ml auf 15,34 ng/ml und zwischen

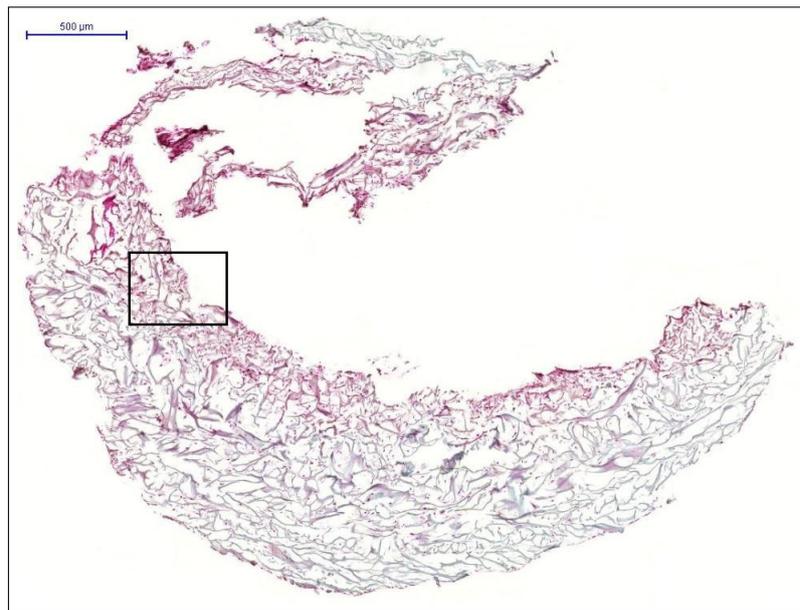


Abbildung 3.39: Versuchsreihe 4: Aufnahme des Konstruktes drei Wochen nach Beimpfung mit einer Million Chondrozyten. Die aufgeimpften Zellen lagern sich an der Oberfläche des Trägers ab. Färbung: SO, Vergr. 3fach

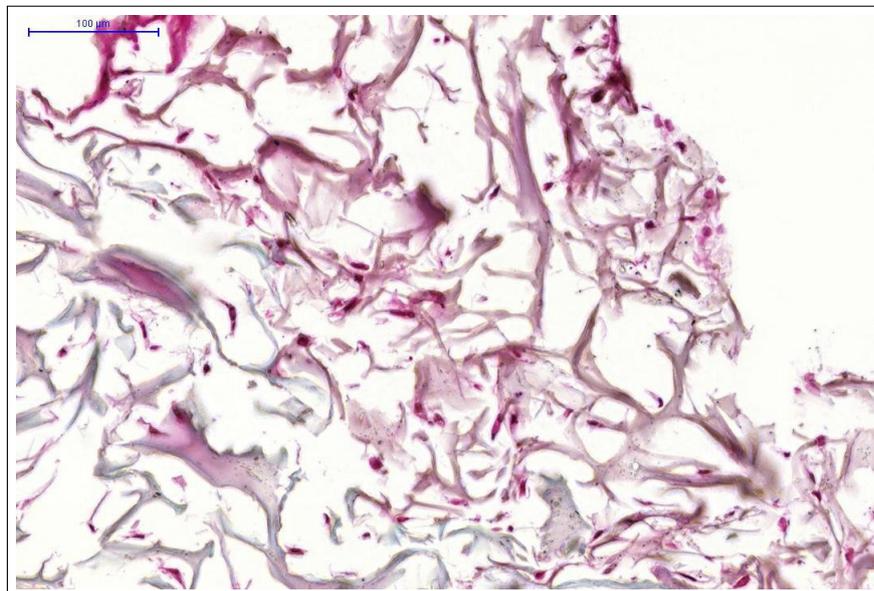


Abbildung 3.40: Versuchsreihe 4: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.39. Die Zellen liegen vereinzelt in dem Gittersystem der Trägermatrix. Die langgestreckten Zellkerne erinnern an Fibroblasten. Färbung: HE, Vergr. 20fach

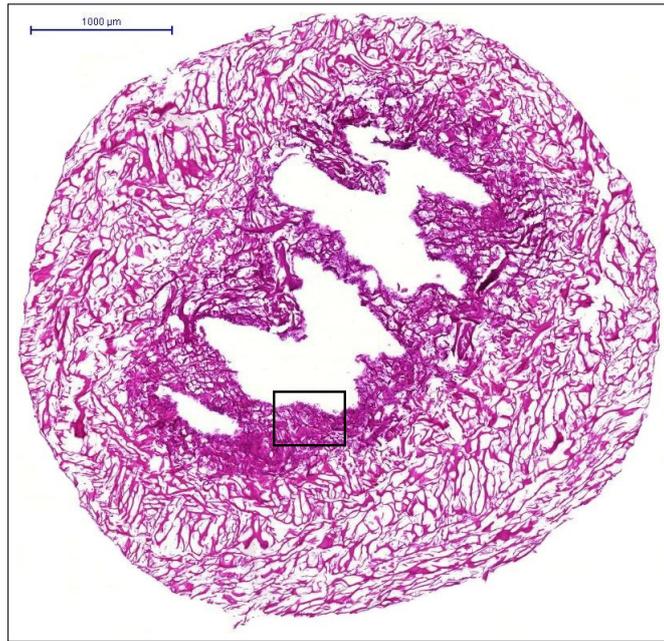


Abbildung 3.41: Versuchsreihe 4: Aufnahme des Konstruktes fünf Wochen nach Beimpfung mit einer Million Chondrozyten. Die Zellen konzentrieren sich um einen Hohlraum innerhalb des Konstruktes. Färbung: HE, Vergr. 2fach

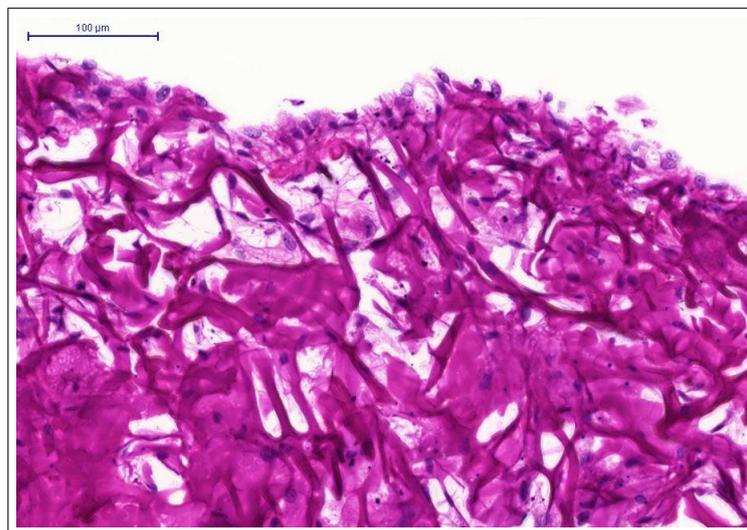


Abbildung 3.42: Versuchsreihe 4: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.41. Es finden sich nur vereinzelt dedifferenzierte Zellen an der Oberfläche der Trägermatrix. Färbung: HE, Vergr. 20fach

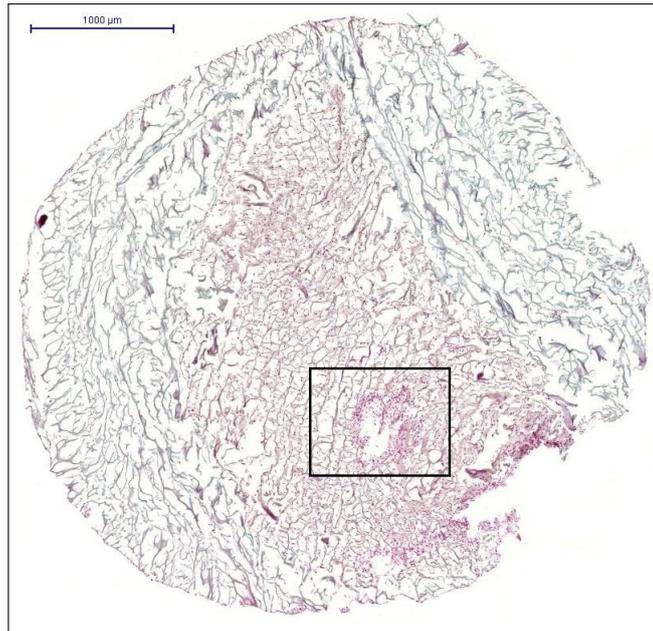


Abbildung 3.43: Versuchsreihe 4: Aufnahme des Konstruktes sieben Wochen nach Beimpfung mit einer Million Chondrozyten. Die dedifferenzierten Zellen lagern sich erneut um den Hohlraum innerhalb des Konstruktes an. Färbung: SO, Vergr. 2fach

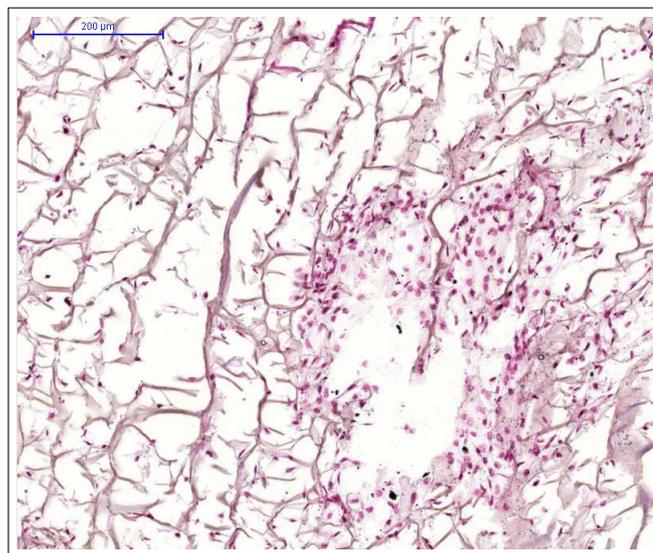


Abbildung 3.44: Versuchsreihe 4: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.43. Die blassrosa angefärbten Zellen um den Hohlraum dringen nicht in das Gitternetz des Trägers ein. Färbung: SO, Vergr. 20fach

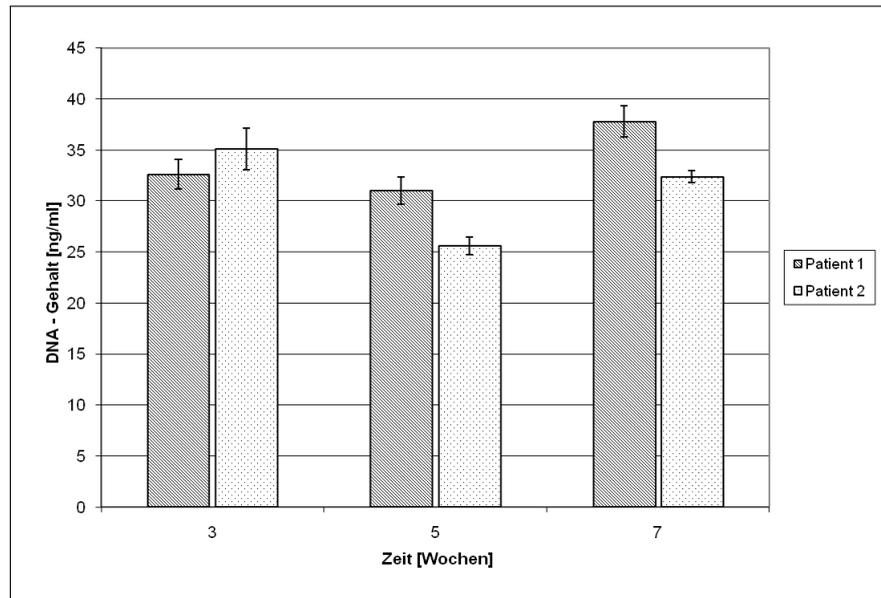


Abbildung 3.45: Versuchsreihe 4: Veränderung des DNA-Gehalts über drei, fünf und sieben Wochen. Verglichen wurden Nasenknorpelbiopsien von zwei Patienten.

Woche fünf und sieben wiederum einen unwesentlichen Anstieg auf 19,70 ng/ml auf.

Bei Patient 2 kann zwischen Woche drei und fünf ein bedeutsamer Abfall des DNA- Gehalts von 35,11 ng/ml auf 25,64 ng/ml und schließlich nach sieben Wochen ein erneut aussagekräftiger Anstieg auf 32,38 ng/ml beobachtet werden. Der DMMB- Assay beschreibt bei Patient 2 zwischen drei und fünf Wochen einen erheblichen Abfall der GAG- Konzentration von 22,86 ng/ml auf 10,39 ng/ml und bis Woche sieben einen weiteren deutlichen Abfall auf 6,65 ng/ml.

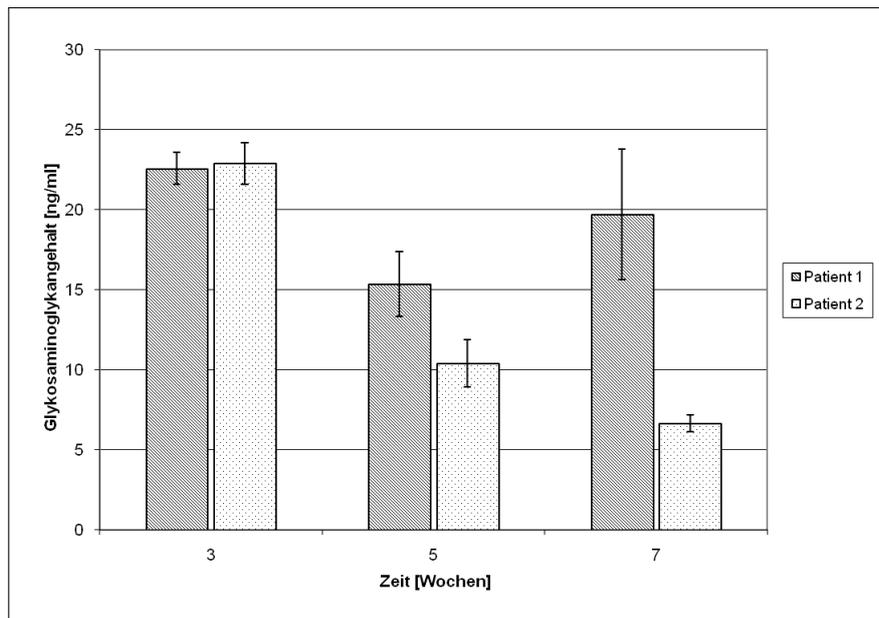


Abbildung 3.46: Versuchsreihe 4: Veränderung des Glykosaminoglykan-Gehalts über drei, fünf und sieben Wochen. Verglichen wurden Nasenknorpelbiopsien von zwei Patienten.

3.4.5 *Versuchsreihe 5*

Nach Entfernung des Trägers, der mit einer Million Chondrozyten beimpft wurde, können 1242 Zellen pro μl ausgezählt werden. Das entspricht 49.680 Zellen pro 40 μl (Fassungsvolumen des Konstruktes). Hiermit ergibt sich ein Verlust von 5 %.

Bei dem mit zwei Millionen Zellen beimpften Konstrukt ergeben sich 2484 Verlustzellen pro μl oder 99.360 Zellen pro 40 μl . Auch hier kann ein Verlust von 5 % festgestellt werden.

Bei der Auszählung der Verlustzellen des mit drei Millionen Zellen besiedelten Trägers errechnen sich 3726 Zellen pro μl oder 149.040 Zellen pro 40 μl . Somit liegt der Anteil der Verlustzellen ebenfalls bei 5 %.

3.4.6 *Versuchsreihe 6*

3.4.6.1 *Histologie*

Die Abbildungen 3.47 und 3.49 zeigen den besiedelten Träger zwei Tage nach Beimpfung mit einer Million Zellen aus der Primärkultur. Als Nährmedium diente DMEM, dem 500 μl Insulin zugesetzt wurde. Auf der AB-gefärbten Abbildung 3.47 sind am unteren Pol des Konstruktes deutlich dicht besiedelte Areale, die jedoch schnell ausdünnen und mittig im Konstrukt nur vereinzelte Zellen zu erkennen. Die 40fache Vergrößerung 3.48 zeigt die Zellen des Randsaums in Nahaufnahme. Die durch die knorpelspezifische Färbung blau angefärbten GAG sind in den Zellkörpern und auch zwischen den Zellen gut zu erkennen. Die Zellen erscheinen kugelig mit rundem Zellkern, was an einen chondrozytenartigen Phänotyp erinnert und wirken vital. Sie füllen die Bälkchenstruktur des Konstruktes gut aus.

Die SO-Färbung auf Abbildung 3.49 stellt ein ähnliches Bild dar: Die Zellen orientieren sich am Rand des Trägers und sind deutlich an ihrer rot-violetten Färbung erkennen. Die 40fache Vergrößerung (Abbildung 3.50) zeigt das dicht mit Zellen ausgefüllte Gitter des Trägermaterials. Die Zellen sind durch die SO-Färbung leuchtend rot-violett eingefärbt und weisen auch hier eine knorpelartige Morphologie auf.

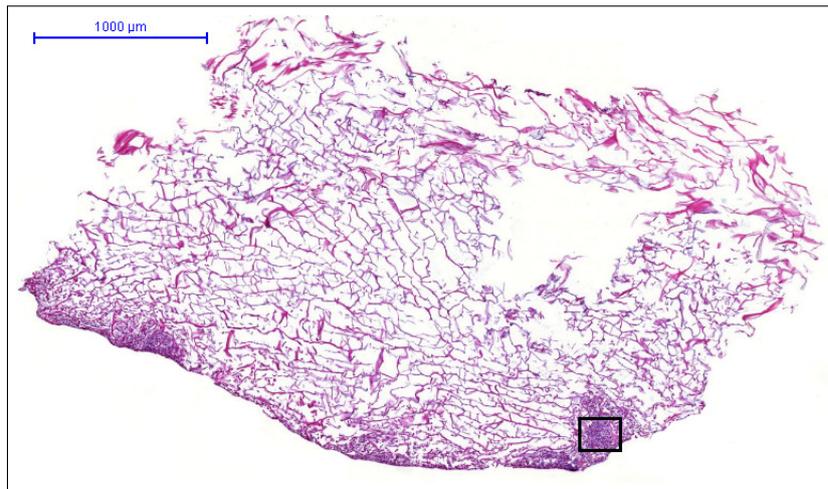


Abbildung 3.47: Versuchsreihe 6: zwei Tage nach Beimpfung, dem Medium wurde Insulin zugefügt. Die Zellen konzentrieren sich an den Randbereichen des Trägers und dringen nur vereinzelt in das Innere durch. Färbung: AB, Vergr. 3,5fach

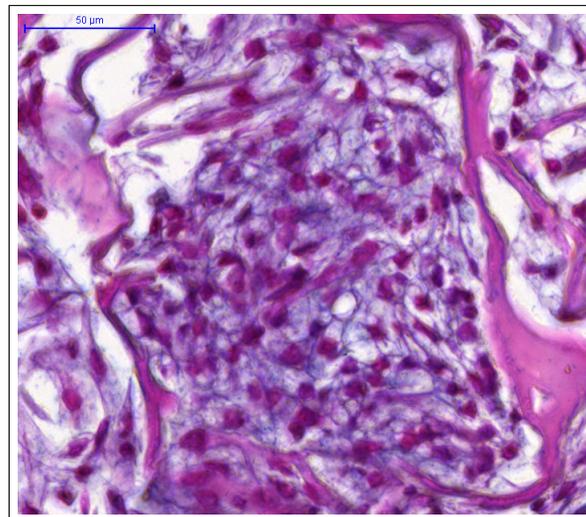


Abbildung 3.48: Versuchsreihe 6: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.47. Die Zellen der dicht besiedelten Areale zeigen einen chondrozytenähnlichen Phänotyp mit mucinreicher Matrix. Färbung: AB, Vergr. 40fach

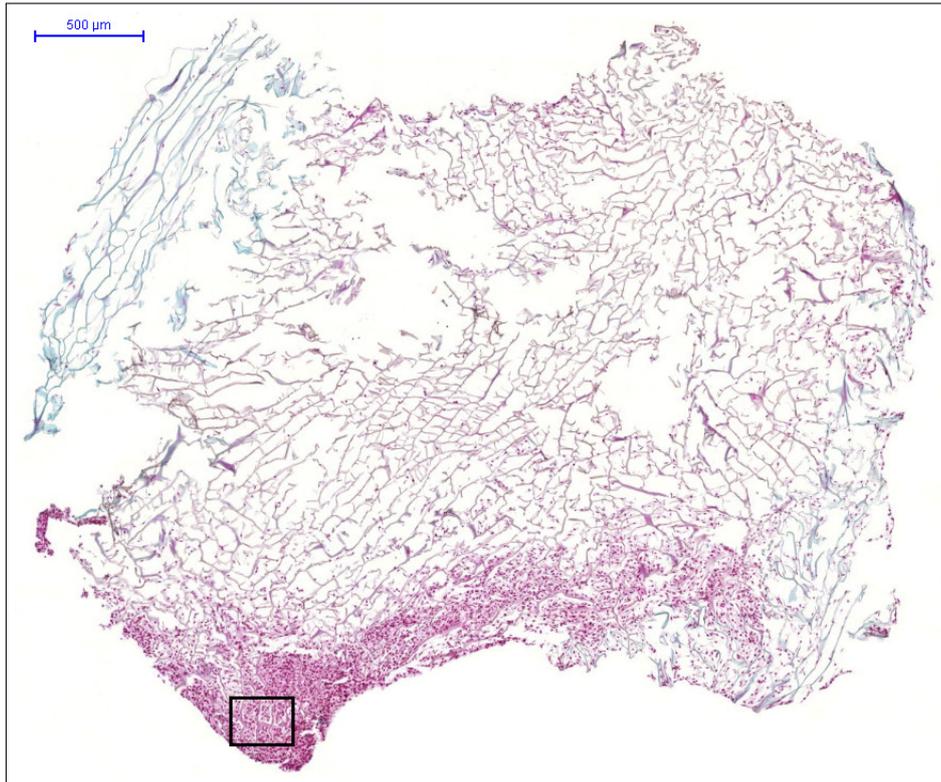


Abbildung 3.49: Versuchsreihe 6: zwei Tage nach Beimpfung, dem Medium wurde Insulin zugefügt. Auch hier lagern sich die chondrozytenähnlichen Zellen an Randbezirken des Trägers ab. Färbung: SO, Vergr. 3fach

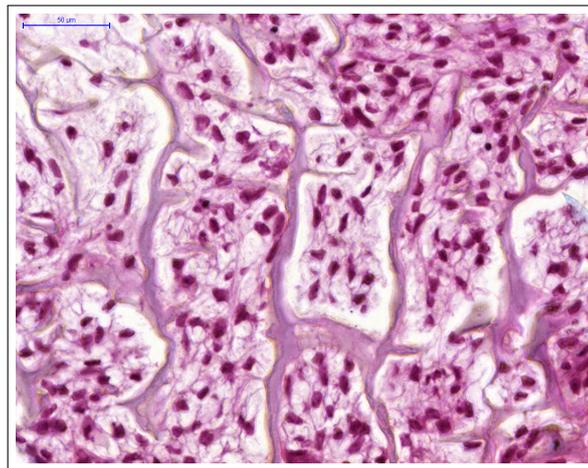


Abbildung 3.50: Versuchsreihe 6: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.49. Die Zellen zeigen eine chondrozytenähnliche Morphologie und füllen das Gitternetz der Trägermatrix gut aus. Färbung: AB, Vergr. 40fach

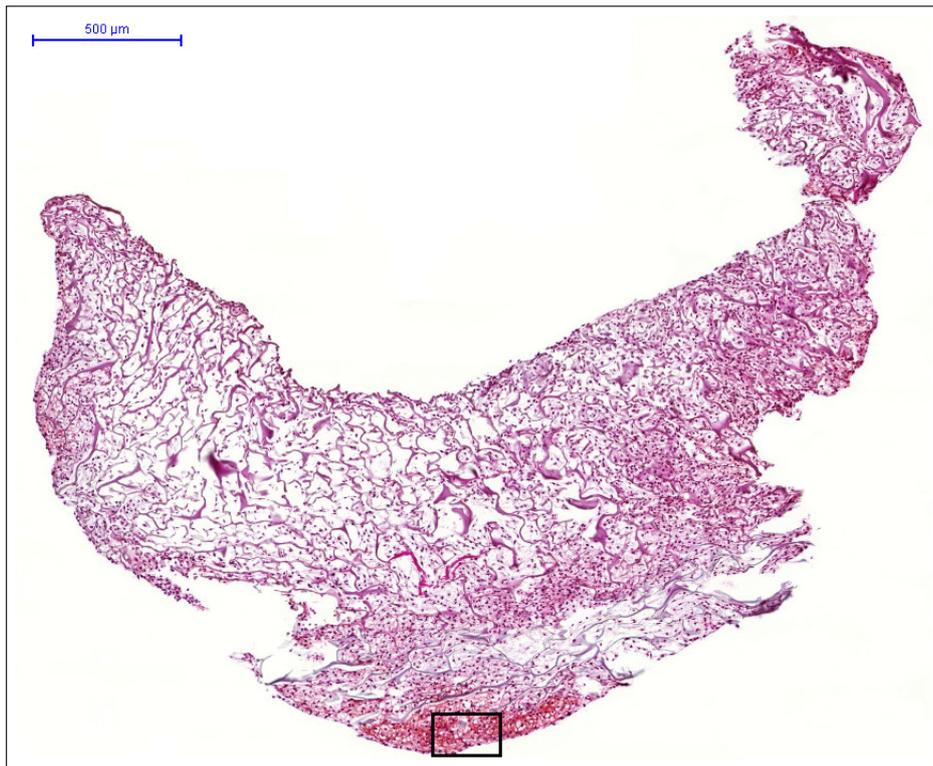


Abbildung 3.51: Versuchsreihe 6: fünf Tage nach Beimpfung, dem Medium wurde Insulin zugefügt. Das Konstrukt ist gut mit Zellen durchsiedelt. Die an den Rändern gelegenen Zellen produzieren Matrix mit hohem Proteoglykangehalt. Färbung: SO, Vergr. 3fach

Fünf Tage nach Ansiedelung von einer Million Zellen der Primärkultur in dem mit Insulin versetzten Nährmedium zeigt sich ein gut mit Zellen durchsiedeltes Konstrukt (Abbildung 3.51). Zellanhäufungen finden sich nach wie vor insbesondere an den Konstruktträgern. Durch die SO-Färbung ist der besiedelte Träger rötlich eingefärbt, was auf einen hohen Proteoglykangehalt schließen lässt. An der unteren Seite des Trägers sind die Zellen leuchtend rot angefärbt und zeigen in der 40fachen Vergrößerung (Abbildung 3.52) eine knorpelzellartige Zellmorphologie. Die Zellkörper sind rund bis rund-oval mit einem rundlichen Zellkern und liegen eingebettet in rot angefarbter EZM.

Die Abbildung 3.53 stellt die Trägermatrix zwei Tage nach der Besiedelung mit einer Millionen Knorpelzellen aus der Primärkultur dar. Hier diente das Chondrocyte Growth Medium als Nährmedium. Das Konstrukt ist bis hin zur abschirmenden Membran gut mit Zellen durchdrungen, die von der SO-Färbung rot-violett eingefärbt wurden. Die Abbildung 3.54 zeigt die 40fache Vergrößerung.

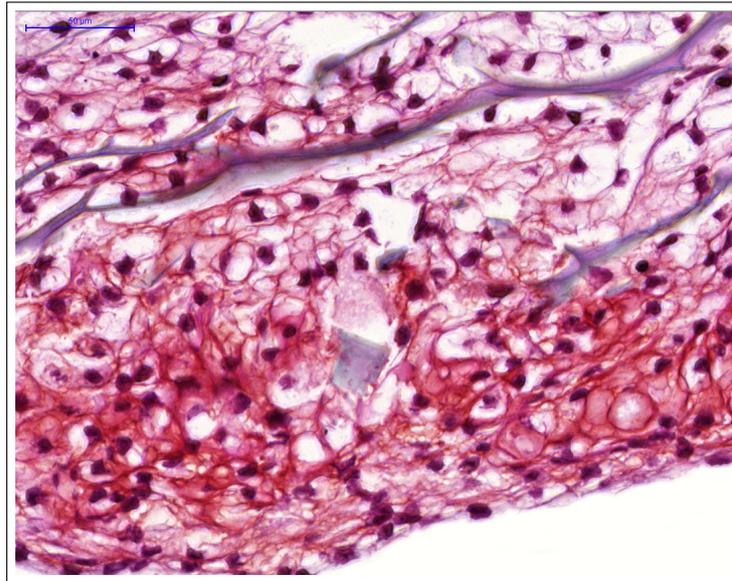


Abbildung 3.52: Versuchsreihe 6: fünf Tage nach Beimpfung, dem Medium wurde Insulin zugefügt. Die Zellen imponieren mit einem kugeligen, chondrozytenartigen Aussehen und liegen eingebettet in rot angefarbter Matrix. Färbung: SO, Vergr. 40fach

Die Zellkörper stellen sich rund bis oval mit gut abgrenzbaren Zellkern dar. Sie sind umgeben und enthalten in der SO- Färbung rot angefarbte Proteoglykane. Abbildung 3.55 zeigt ein 5fach vergrößertes Trägerkonstrukt fünf Tage nach der Beimpfung. Durch die AB- Färbung wurden die GAG blau-violett angefarbt und zeigen eine homogene Ansiedelung der Zellen im gesamten Träger. In der 20fachen Vergrößerung 3.56 erscheinen die Zellen blassblau mit eher ovalem Zellkörper in ovalem Zellkern.

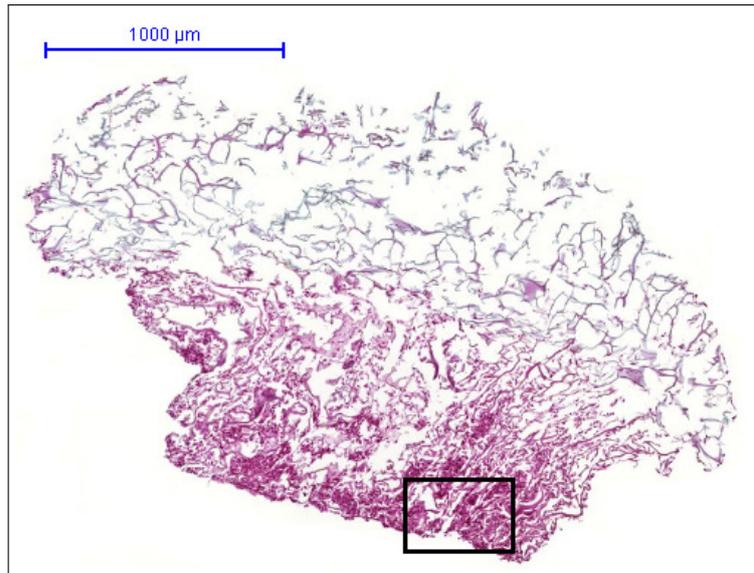


Abbildung 3.53: Versuchsreihe 6: zwei Tage nach Beimpfung, als Medium diente CGM. Das Konstrukt ist bis zur abschirmenden Membran gut mit Zellen durchdrungen. Färbung: SO, Vergr. 2fach

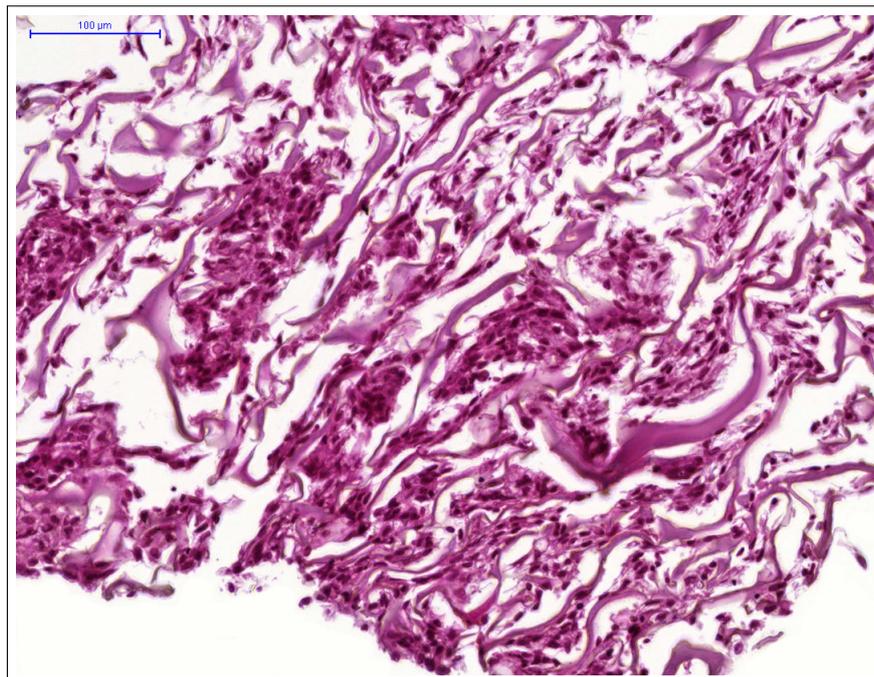


Abbildung 3.54: Versuchsreihe 6: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.53. Die abgebildeten Zellen erscheinen rund-oval und sind von rot angefärbter Matrix umgeben. Färbung: SO, Vergr. 20fach

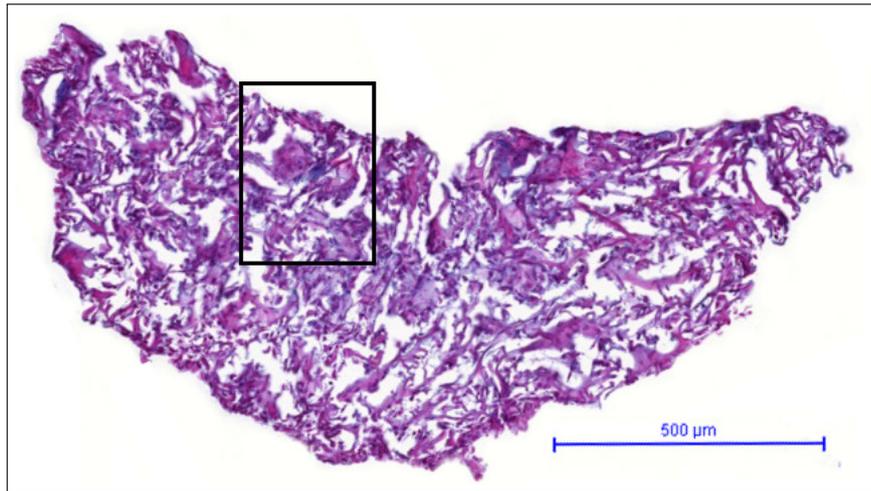


Abbildung 3.55: Versuchsreihe 6: fünf Tage nach Beimpfung, als Medium diente CGM. Die Zellen haben sich homogen in dem Gitternetz des Trägers angesiedelt. Färbung: AB, Vergr. 5fach

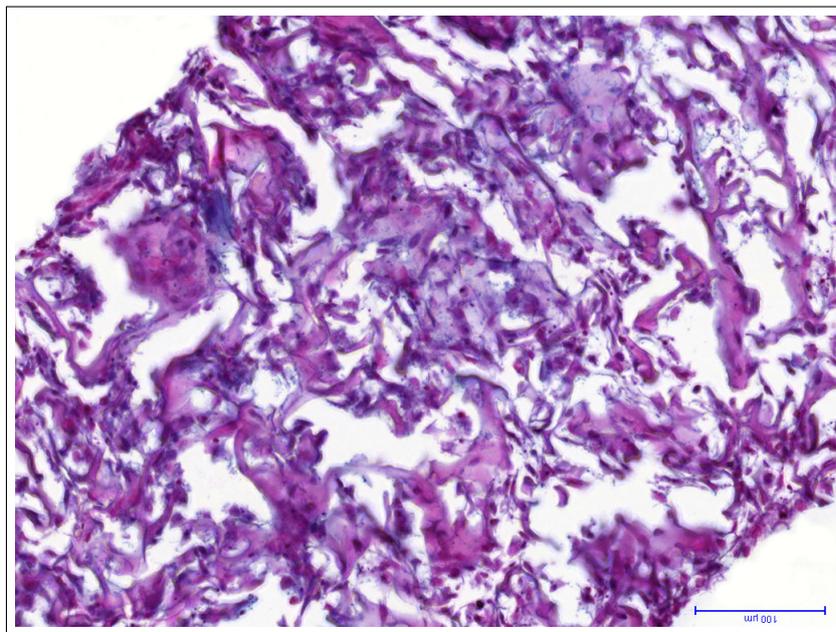


Abbildung 3.56: Versuchsreihe 6: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.55. Die Zellen erscheinen länglich und sind von GAG-reicher Matrix umgeben. Färbung: AB, Vergr. 20fach

3.4.6.2 Biochemische Auswertung

Die Grafik 3.57 stellt die zeitabhängige Veränderung des DNA-Gehalts in unterschiedlichen Nährmedien (DMEM + Insulin und CGM) dar. Das Konstrukt, das

mit den Zellen beimpft wurde, die mit **DMEM** + Insulin versorgt wurden, zeigt zwischen zwei und fünf Tagen eine relevante Zunahme des **DNA**- Gehalts von 40 ng/ml auf 49,3 ng/m. Die mit in **CGM** kultivierten Zellen beimpfte Trägermatrix zeigt zwischen Tag zwei und Tag fünf eine nur leichte Abnahme des **DNA**-Gehalts von 47,4 ng/ml auf 46 ng/ml.

Die zeitabhängige Veränderung des **GAG**- Gehalts in den unterschiedlichen Nährmedien ist durch Grafik 3.58 dargestellt. Hier zeigt sich bei dem Konstrukt, dessen Medium Insulin zugefügt wurde, zwischen zwei und fünf Tagen ein relativ konstanter Verlauf der **GAG**- Konzentration. Durch die Verwendung des **CGM** lässt sich zwischen Tag zwei und Tag fünf ein deutlicher Anstieg des **GAG**-Gehalts von 22,1 ng/ml auf 35,2 ng/ml verzeichnen.

Die mit Insulin behandelten Zellen zeigen also eine Zunahme des **DNA**- Gehalts (entsprechend einer Zunahme der Zellzahl) bei gleichbleibendem **GAG**- Gehalt, während die mit **CGM** versorgten Zellen bei gleichbleibendem **DNA**- Gehalt eine erhöhte **GAG**- Synthese aufweisen (entsprechend einer erhöhten Matrixproduktion).

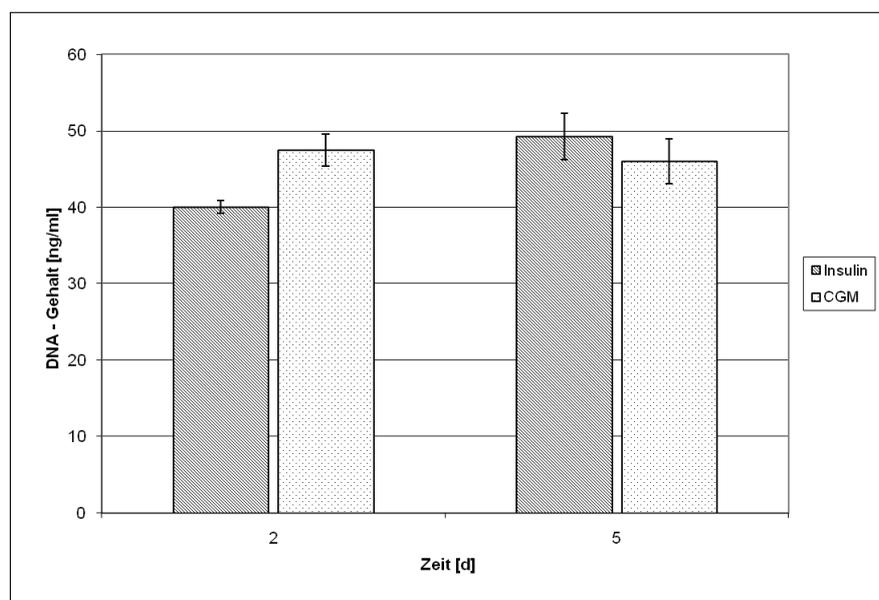


Abbildung 3.57: Versuchsreihe 6: zeitabhängige Veränderung des **DNA**- Gehalts in zwei unterschiedlichen Nährmedien (**DMEM** + Insulin vs. **CGM**)

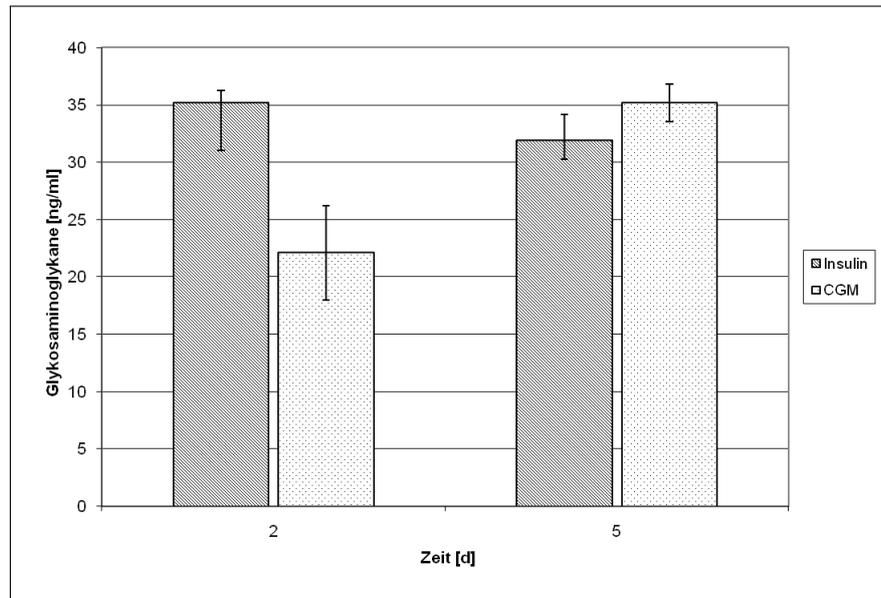


Abbildung 3.58: Versuchsreihe 6: zeitabhängige Veränderung des GAG- Gehalts in zwei unterschiedlichen Nährmedien (DMEM + Insulin vs. CGM)

3.4.7 Versuchsreihe 7

3.4.7.1 Histologie

Die Abbildungen 3.59 und 3.61 zeigen die Übersichtsaufnahmen der Zellen, die nach einmaliger Passage direkt auf Objektträgern angesiedelt wurden. 3.59 durch die AB- Färbung blau bis violett eingefärbte runde bis rundlich-ovale Zellen mit zentralem Zellkern. In der zofachen Vergrößerung sind die zwischen den Zellkörpern dunkelblau leuchtenden GAG der EZM deutlich sichtbar.

In der SO- Färbung auf Abbildung 3.61 erscheinen die Zellen rosa bis rot und zeigen eine streifige, fibroblastenartige Anordnung. In der 3ofachen Vergrößerung 3.62 sind knorpeltypische Zellen mit rundem Korpus und zentralem rundem Zellkern sowie langgezogene, schmale Zellen mit länglichem Zellkern zu sehen. Alle Zellen sind durch die SO- Färbung rötlich angefärbt, was auf einen hohen Proteoglykangehalt schließen lässt.

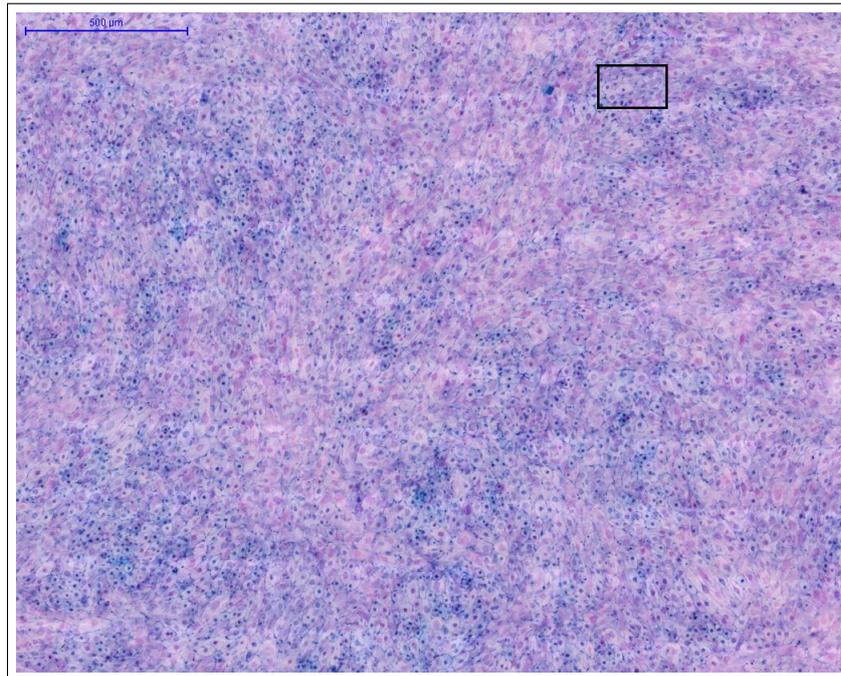


Abbildung 3.59: Versuchsreihe 7: direkte Ansiedelung der Zellen auf Objektträgern. Die Zellen erscheinen chondrozytenartig und lassen sich in der AB- Färbung bläulich anfärben. Färbung: AB, Vergr. 5fach

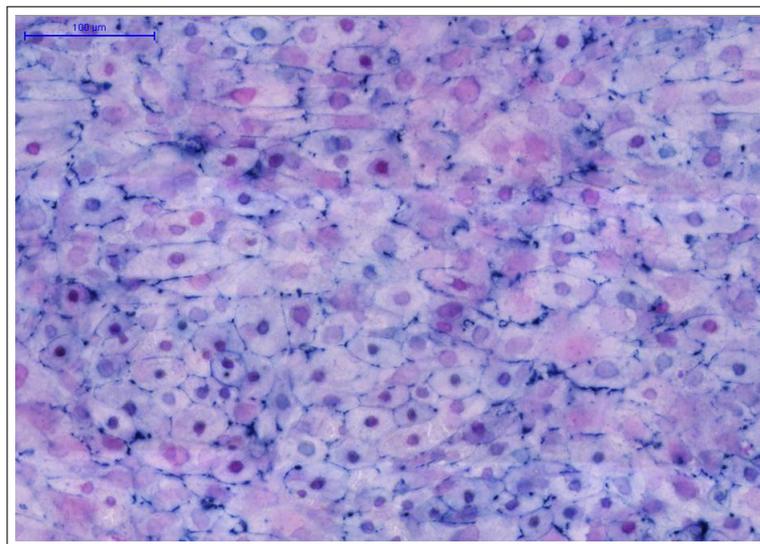


Abbildung 3.60: Versuchsreihe 7: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.59. Die rundlichen Zellen mit zentralem Kern zeigen einen knorpelähnlichen Phänotyp. Färbung: AB, Vergr. 20fach

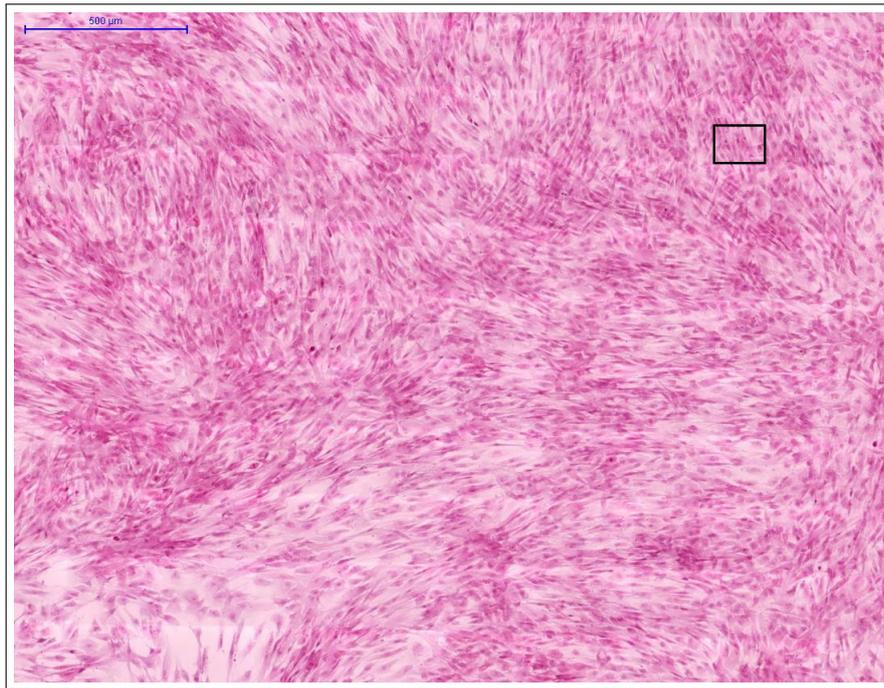


Abbildung 3.61: Versuchsreihe 7: direkte Ansiedelung der Zellen auf Objektträgern. Zwar lässt die rosa Färbung auf einen hohen Proteoglykangehalt und somit auf knorpelartiges Zellmaterial schließen, die streifige Anordnung spricht jedoch für eine Dedifferenzierung der Zellen im zweidimensionalen Zellverband. Färbung: SO, Vergr. 5fach

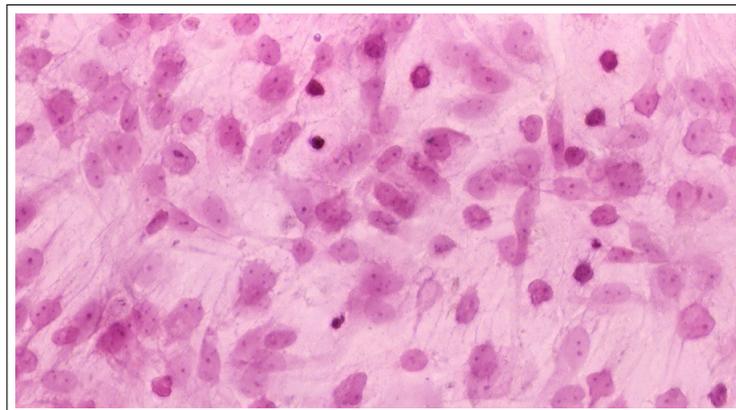


Abbildung 3.62: Versuchsreihe 7: vergrößerter Bildausschnitt aus 3.61, Färbung: SO, Vergr. 30fach

Teil IV

DISKUSSION

DISKUSSION

Gerade in der Hals- Nasen- Ohrenheilkunde stellen Knorpeldefekte oftmals eine ästhetisch sowie funktionell beeinträchtigende Problematik dar. Die Schwierigkeiten bei der Gewinnung von ausreichend körpereigenem Material zur Defektdeckung von Knorpelschäden begründet die hohe Bedeutung von Tissue Engineering in der rekonstruktiven Kopf- Hals- Chirurgie. Während die bestmögliche Versorgung solcher Läsionen durch Mangel an Ersatzgewebe oder unzureichende Formgebung limitiert wird, können mittels kleiner Biospie gewonnene Chondrozyten *in vitro* auf ein Vielfaches ihrer Zahl vermehrt und mithilfe von (dreidimensionalen) Trägermaterialien für die optimale Behandlung von Knorpelschäden unterschiedlicher Größe und Form eingesetzt werden.

Für die *in vitro* Expansion der Chondrozyten müssen diese zunächst aus einer Knorpelbiopsie mittels Gewebeverdau enzymatisch isoliert werden. Anschließend können sie in Monolayerkultur angesiedelt und zur weiteren Zellvermehrung mehrmals passagiert werden.

Von mehreren Autoren wird das Phänomen der Dedifferenzierung, also der Verlust der morphologischen, physiologischen und funktionellen Charakteristika der Chondrozyten in Monolayerkultur beschrieben [44, 74, 62]. Bereits wenige Tage nach Ansiedelung verlieren die Zellen ihre typische runde Zellmorphologie und bilden eine spindelförmige, fibroblastenartige Form aus. Die Kollagen- II- Synthese wird beendet und stattdessen knorpeluntypisches Kollagen- I produziert. Auslöser hierfür können neben einer ungenügenden Nährstoffversorgung eine flächenhafte Zellausbreitung, die Anheftung der Chondrozyten an einen ungeeigneten Träger oder das Fehlen einer dreidimensionalen EZM sein [11].

1982 schilderten Benya und Shaffer die Möglichkeit der Redifferenzierung vorherig dedifferenzierter Chondrozyten durch den Einsatz von Agarose [3]. Durch geeignete Anpassung der Zellkulturbedingungen ist es also möglich, den Phänotyp von Knorpelzellen zu beeinflussen. Die Ansiedlung in einer dreidimensionalen Zellkultur, z.B. mittels einer gelartigen Matrix wie Agarose, kann die

Beibehaltung der chondrozytentypischen Eigenschaften unterstützen. Jedoch kann Agarose insbesondere den mechanischen und formgebenden Eigenschaften des Knorpelgewebes nicht gerecht werden [12, 31].

Neben einer ausreichenden Chondrozytenzahl sind geeignete Zellträger Voraussetzung für die Herstellung eines dreidimensionalen Zellverbandes. Für den Ersatz formgebenden Knorpelgewebes ist eine mechanische Stabilität des Trägermaterials wichtig, um eine spätere Verformung des Materials zu verhindern. Die Trägermatrix sollte bei möglichst minimalem Fremdvolumen eine größtmögliche Materialoberfläche bieten, um die dreidimensionale Ansiedelung der Zellen zu fördern und die ungehinderte Matrixsynthese zu unterstützen [11, 59].

Derzeit stehen eine Vielzahl von Zellträgern unterschiedlicher Architektur und Zusammensetzung zur Herstellung dreidimensionaler Knorpelkonstrukte zur Verfügung. Hierbei ist es wichtig, dass die Knorpelzellen bei der Anheftung an den Träger ihren runden Phänotyp beibehalten [11, 73, 17].

Die vorranige Zielsetzung dieser experimentellen Untersuchung war die Ansiedelung vitaler Chondrozyten auf der neuartigen Trägermatrix Novocart® 3D in Hinblick auf die Eignung als Knorpelersatz in der rekonstruktiven Kopf- Hals-Chirurgie.

Die Zellisolierung aus humanem Septumknorpel wurde reproduzierbar durchgeführt und erbrachte konstante Ergebnisse. Auch aus einem kleinen Septumknorpelbiopsat konnte eine gute Expansion der Chondrozyten nachgewiesen werden. So konnten aus einem Gramm Knorpel etwa 33 Millionen Zellen expandiert werden. Eine unbegrenzte Zellvermehrung in vitro ist jedoch nicht zu erwarten [33].

Hier zeigt sich, dass selbst größere Gewebsdefekte durch Entnahme von nur wenig Eigengewebe erfolgreich gedeckt werden können [64]. Der Anteil der nicht auf dem Träger angesiedelten Chondrozyten blieb mit 5 % (auch bei Besiedelung mit unterschiedlichen Zellzahlen) bemerkenswert gering und spricht für eine hohe Attraktivität des Materials für die Knorpelzellen.

Durch die neuartige, komplexe Architektur von Novocart® 3D konnten die Chondrozyten direkt auf die Konstruktoberfläche aufgetragen werden und wurden durch die säulenartig angeordneten Kollagenbälkchen in den oberflächlichen Teil

des Schwammes aufgenommen. Die abschließende Membran und die senkrecht dazu verlaufende Architektur des Schwammes verhinderten das Austreten der Zellen aus dem Konstrukt. Auf den histologischen Aufnahmen erschien der abschließende Teil von Novocart® 3D zellfrei. Die Forschergruppe um Nuernberger untersuchte die Adhäsion der Chondrozyten an Novocart® 3D. Die Experimente zeigten, dass die Anheftung der Knorpelzellen mit Unterstützung von Mikrovilli erfolgt, die den Kontakt zu der Konstruktoberfläche herstellen. Auffallend ist außerdem die direkte Anheftung der Chondrozyten an den Träger ohne zwischenliegende autologe Matrix. Die Zellen nisten sich auf den interkonnektierenden Fasern zwischen den Kollagensäulen ein und umhüllen diese zarten Fasern teilweise oder komplett mit ihrem Zellkörper [55].

Unsere Untersuchungen verschiedener Beimpfungsstrategien konnten diesen Adhäsionsprozess zwar bekräftigen, allerdings konnte keine homogene Zellansiedelung auf der Matrix erreicht werden. Die besten Ergebnisse wurden durch das direkte mechanische Aufimpfen der Zellsuspension auf der Schwammseite des Konstruktes und die Aufnahme der Zellen mittels Kapillarwirkung erzielt. Das direkte Einspritzen der Zellen in die Mitte der Trägermatrix bewirkte zwar eine Kumulation der Chondrozyten in dem Gerüst, die Zellen dedifferenzierten jedoch rasch aufgrund der räumlichen Enge und verminderten Nährstoffversorgung.

Die schon in anderen Arbeiten erwähnte Veränderung des Phänotyps in Monolayerkultur ließ sich in dieser Arbeit ebenfalls nachweisen: bereits nach einigen Tagen in Kultur wuchsen die Zellen in einer fibroblastenähnlichen, streifenförmigen Formation entlang des Zellkulturflaschenbodens und verloren ihre knorpeltypische Erscheinung.

Nach Übertragung in den dreidimensionalen Zellträger Novocart® 3D zeigte sich nur teilweise eine Redifferenzierung der Zellen. Vor allem an den Randbereichen des Konstruktes siedelten sich Zellen mit knorpelähnlichem Phänotyp ab. Die Knorpelzellen konnten problemlos auf das Konstrukt aufgebracht werden und zeigten ohne Unterstützung wie beispielsweise Fibrinkleber eine gute Adhärenz an die Trägermatrix. Die angesiedelten Zellen konnten auch nach sieben Wochen in vitro in der Trägermatrix nachgewiesen werden.

Mehrere Forschergruppen beschreiben unabhängig voneinander eine bevorzugte Ablagerung der EZM an der Peripherie des Trägerkonstruktes. Die zentrale Zone des besiedelten Materials hingegen ist arm an Matrix und Zellen. Mögliche Ursachen könnten die ungleichmäßige Zellansiedelung bei der Beimpfung oder auch Diffusionslimitierungen der Zellen der Innenzone des Konstruktes sein [65, 44].

Die vorliegende Arbeit kann diese Beobachtungen bestätigen. Insbesondere an den Randbereichen der Trägermatrix fanden sich Gebiete hoher Zelldichte mit vitalen, histologisch knorpelähnlich angefärbten Zellen. Teilweise konnten auch innerhalb des besiedelten Konstruktes chondrozytenähnliche Zellen erfasst werden, jedoch nicht in der Ausprägung wie an den Randsäumen des Trägers. Die Zellbesiedelung konzentrierte sich vor allem auf die Konstruktoberfläche, eine homogene Besiedelung war nur teilweise möglich.

Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit ist die Analyse und der Vergleich unterschiedlicher Besiedelungszellzahlen.

Hier konnten durch die biochemischen Analysen stabile Zellzahlen über drei, fünf und sieben Wochen nachgewiesen werden. Die mit zwei Millionen Zellen beimpften Konstrukte konnten zu allen drei Messzeitpunkten den höchsten DNA-Gehalt aufweisen, gefolgt von den mit drei Millionen Zellen besiedelten Konstrukten. Bei der Ansiedelung von einer Million Chondrozyten konnte zwischen der dritten und fünften Woche eine Zunahme der Zellzahl verzeichnet werden. Diese Ergebnisse gleichen Feststellungen anderer Arbeitsgruppen, die eine ansteigende GAG- und Kollagenproduktion und verbesserte Konstruktentwicklung bei der Besiedelung mit höheren Zellzahlen nachwiesen [66, 61, 46, 47]. In ausreichender Dichte angesiedelte Chondrozyten entwickelten einen stabileren Phänotyp und exprimierten mehr Kollagen-II als in niedriger Dichte kultivierte Zellen. Watt erklärte dieses Phänomen durch die vermehrte Zellteilung phänotypisch instabiler Chondrozyten in Kultur mit zu niedriger Zelldichte [70]. Da der DNA-Gehalt jedoch keine Auskunft über die Zellart und Zellproduktivität geben kann, ist es notwendig, den DNA und GAG-Verlauf einander gegenüberzustellen.

Der GAG-Gehalt stieg nach der Ansiedelung mit einer halben, einer und zwei Millionen bis zur fünften Woche zunächst an, um schließlich bis zur siebten Woche wieder zu sinken. Nach drei Wochen schienen sich die Zellen nun entweder

wieder zu dedifferenzieren (die Zellzahl blieb konstant) und die Matrixsynthese einzustellen oder aber die Syntheseleistung aufgrund der begrenzten räumlichen Möglichkeiten im Konstrukt zu reduzieren. Bei der Besiedelung mit zwei Millionen wurde die GAG- Synthese bereits nach der dritten Woche eingeschränkt. Dieser Sachverhalt kann durch den von vornherein vorhandenen Zellüberfluss und die dadurch bedingte räumliche Enge erklärt werden.

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Förderung der Redifferenzierung der Chondrozyten wird in vielen Arbeiten thematisiert. Blunk et al. verglichen und kombinierten 2002 mehrere Wachstumsfaktoren miteinander und untersuchten deren Einfluss auf Nassgewicht des besiedelten Trägers, Synthese von EZM und den Gehalt an GAG und Kollagen. Die positive Wirkung von IGF-I, TGF- β oder Interleukin (IL)-4 ist jedoch von vielen Faktoren abhängig: so haben unter anderem die Zelldichte, das Stadium der Zellentwicklung, die schon synthetisierte Menge an EZM oder die Spezies des Zelldonors Auswirkungen auf den Erfolg. Hier wird deutlich, dass selbst bei gut erforschter Wirkung der Einzelfaktoren das Ergebnis bei leicht veränderten Versuchsbedingungen schwer vorherzusagen ist [74, 30, 6, 57]. Um den Prozess der Redifferenzierung auszulösen sind Wachstumsfaktoren nicht dringend notwendig, da schon das Einbringen der Zellen in eine dreidimensionale Umgebung diese unterstützt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Insulin auf die Zellentwicklung untersucht. Insulin gleicht strukturell dem IGF-I und kann so den IGF-I- Rezeptor aktivieren. Es ist bekannt, dass IGF-I die Biosynthese der EZM in den Chondrozyten fördert. Insulin als Nährmedienzusatz erweist sich also als wirksames Stimulans der Matrixproduktion [51].

Auch in unseren Versuchen zeigte sich eine deutlich positive Wirkung in Hinblick auf die Redifferenzierung der Zellen. Auf den histologischen Kontrollbildern ließen sich die angesiedelten Zellen in den knorpelspezifischen Färbungen (Safranin-O und Alcianblau-Kernechtrot) gut einfärben und zeigten morphologisch einen knorpelähnlichen Phänotyp. Biochemisch konnte bereits in den ersten fünf Tagen nach der Matrixbesiedelung eine Zunahme der Zellzahl um ca. 20% nachgewiesen werden.

Eine ebenfalls erfreuliche Zellentwicklung konnte bei dem Einsatz von CGM beobachtet werden. Auch hier bildeten die Zellen nach Aufbringen auf das

Konstrukt eine chondrozytenähnliche Morphologie aus. Bei gleichbleibender Zellzahl zeigte sich eine deutliche Erhöhung der GAG- Synthese und damit eine Erhöhung der Syntheseleistung der Zellen.

Die Verwendung von wachstumsfördernden Kulturmedien kann also durchaus als sinnvoll betrachtet werden, um die Differenzierung und Syntheseleistung der kultivierten Zellen zu unterstützen. Hier ist beispielsweise schon der Einsatz von Insulin ausreichend, um die Wachstumsbedingungen zu optimieren.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungsergebnisse, dass die Matrix Novocart® 3D als Bioscaffold für Tissue Engineering mit humanen Chondrozyten einen interessanten Forschungsansatz darstellt. Die Knorpelzellen lassen sich in einem dreidimensionalen Zellverband ansiedeln und zeigen, ohne zusätzlichen Einsatz von Bindematerialien wie beispielsweise Fibrinkleber, eine gute Adhäsion an das Trägermaterial.

Durch die Wahl geeigneter Nährmedien kann das Wachstumsverhalten darüber hinaus positiv beeinflusst werden. Sowohl der Zusatz von Insulin als auch der Einsatz des CGM führten zu der Ausbildung einer chondrozytenähnlichen Zellmorphologie und zu einer gesteigerten Redifferenzierung der durch die Expansion dedifferenzierten Chondrozyten.

Die Verwendung von Novocart® 3D als Basis für Tissue Engineering erscheint nach unseren Untersuchungen möglich und sollte in zukünftigen Studien in Hinblick auf die Verwendung in der rekonstruktiven Chirurgie weiter analysiert werden.

Teil V

ANHANG

ANHANG

A.1 MESSWERTTABELLEN DER BIOCHEMISCHEN ASSAYS

A.1.1 *DNA- Assay nach Hoechst*

	<i>Messwerte [ng/ml]</i>		
Woche 3: 0,5 Mio Zellen	36,90	40,37	40,70
Woche 3: 1 Mio Zellen	42,42	41,05	40,30
Woche 3: 2 Mio Zellen	41,76	67,30	66,66
Woche 3: 3 Mio Zellen	63,36	60,95	42,53
Woche 5: 0,5 Mio Zellen	42,55	45,12	48,91
Woche 5: 1 Mio Zellen	48,32	47,49	47,62
Woche 5: 2 Mio Zellen	54,54	54,32	52,39
Woche 5: 3 Mio Zellen	49,62	48,84	48,14
Woche 7: 0,5 Mio Zellen	47,27	45,94	46,38
Woche 7: 1 Mio Zellen	41,13	42,04	48,10
Woche 7: 2 Mio Zellen	49,24	51,98	50,02
Woche 7: 3 Mio Zellen	42,52	41,72	46,99

Tabelle A.1: Messwerte des Hoechst -Assays der Versuchsreihe 2 nach Einsetzen in die Geradengleichung

	<i>Messwerte [ng/ml]</i>		
Patient 1, Woche 3	34,27	31,42	32,20
Patient 1, Woche 5	29,49	31,88	31,67
Patient 1, Woche 7	36,59	37,15	39,53
Patient 2, Woche 3	37,33	34,55	33,44
Patient 2, Woche 5	26,07	24,65	26,19
Patient 2, Woche 7	32,98	31,79	32,36

Tabelle A.2: Messwerte des Hoechst -Assays der Versuchsreihe 4 nach Einsetzen in die Geradengleichung

	<i>Messwerte [ng/ml]</i>		
DMEM + Insulin, Tag 2	39,05	40,44	40,51
DMEM + Insulin, Tag 5	45,80	51,52	50,41
CGM, Tag 2	45,18	47,76	49,39
CGM, Tag 5	43,66	49,34	45,13

Tabelle A.3: Messwerte des Hoechst -Assays der Versuchsreihe 6 nach Einsetzen in die Geradengleichung

A.1.2 DMMB- Assay

	<i>Messwerte [ng/ml]</i>		
Woche 3: 0,5 Mio Zellen	12,68	16,94	12,26
Woche 3: 1 Mio Zellen	10,34	10,55	10,34
Woche 3: 2 Mio Zellen	7,79	11,83	12,04
Woche 3: 3 Mio Zellen	28,64	26,94	32,68
Woche 5: 0,5 Mio Zellen	21,83	19,70	21,62
Woche 5: 1 Mio Zellen	21,19	21,83	19,28
Woche 5: 2 Mio Zellen	20,98	20,98	25,87
Woche 5: 3 Mio Zellen	17,15	18,21	16,72
Woche 7: 0,5 Mio Zellen	19,06	17,79	17,57
Woche 7: 1 Mio Zellen	15,66	15,45	16,09
Woche 7: 2 Mio Zellen	17,57	21,83	23,32
Woche 7: 3 Mio Zellen	17,57	17,36	18,85

Tabelle A.4: Messwerte des DMMB -Assays der Versuchsreihe 2 nach Einsetzen in die Geradengleichung

	<i>Messwerte [ng/ml]</i>		
Patient 1, Woche 3	23,53	22,89	22,68
Patient 1, Woche 5	18,00	15,45	14,81
Patient 1, Woche 7	15,45	23,53	20,13
Patient 2, Woche 3	22,04	22,26	24,38
Patient 2, Woche 5	11,40	10,98	08,21
Patient 2, Woche 7	7,15	6,09	6,72

Tabelle A.5: Messwerte des DMMB -Assays der Versuchsreihe 4 nach Einsetzen in die Geradengleichung

	<i>Messwerte [ng/ml]</i>		
DMEM + Insulin, Tag 2	35,66	35,87	33,96
DMEM + Insulin, Tag 5	33,32	29,28	33,11
CGM, Tag 2	17,36	24,38	24,60
CGM, Tag 5	36,51	36,51	33,11

Tabelle A.6: Messwerte des DMMB -Assays der Versuchsreihe 6 nach Einsetzen in die Geradengleichung

Teil VI

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Bei der Erstellung dieser Dissertation waren zahlreiche Menschen beteiligt, bei denen ich mich hier herzlich bedanken möchte:

Zunächst bedanke ich mich bei Univ.- Prof. Dr. Henning Bier für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Staudenmair danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die jahrelange verlässliche Unterstützung und Betreuung.

Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Marc Burghartz für seine Hilfe bei allen Fragen und Belangen.

Besonders danken möchte ich Dr. Sybille Regn, die mir bei dieser Arbeit stets mit Rat und Tat und vielen Ideen zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich bei all meinen Kollegen aus der Forschungsgruppe Tissue Engineering, insbesondere bei meiner Mitdotorandin Helena Mayer.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von Herzen bei meiner Familie und Vanessa Leistner für ihre unermüdliche Unterstützung, Motivation und ihren Beistand nicht nur bei dieser Dissertation, sondern während der gesamten Studienzeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Barbero, A., S. P. Grogan, P. Mainil-Varlet und I. Martin: *Expansion on specific substrates regulates the phenotype and differentiation capacity of human articular chondrocytes*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98:1140–1149, 2006.
- [2] Behrens, P., U. Bosch, J. Bruns, C. Erggelet, S.A. Esenwein, C. Gaissmaier, T. Krackhardt, J. Löhnert, S. Marlovits, N.M. Meenen, J. Mollenhauer, S. Nehrer, F.U. Niethard, U. Nöth, C. Perka, W. Richter, D. Schäfer, U. Schneider, M. Steinwachs und K. Weise: *Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft "Gewebereneration und Gewebeersatz" zur Autologen Chondrozyten- Transplantation* act. *Z Orthop*, (142):529–539, 2004.
- [3] Benya, P. D. und J. D. Shaffer: *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. *Cell*, 30:215–224, 1982.
- [4] Bhardwaj, T., R. M. Pilliar, M. D. Grynblas und R. A. Kandel: *Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57:190–199, 2001.
- [5] Bisceglie, V.: *Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-Embryonen*. *Krebsforschung*, 40:122–140, 1933.
- [6] Blunk, T., A.L. Sieminski, K.J. Gooch, D.L. Courter, A.P. Hollander, A.M. Nahir, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic und L.E. Freed: *Differential Effects of Growth Factors on Tissue-Engineered Cartilage*. *Tissue Engineering*, 8(1):73–84, 2002.
- [7] Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson und L. Peterson: *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. *The New England Journal of Medicine*, 331(14):889–895, 1994.
- [8] Brodtkin, K. R., A. J. Garcia und M. E. Levenston: *Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers*. *Biomaterials*, 25:5929–5938, 2004.

- [9] Bryant, S. J. und K. S. Anseth: *Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 64 A:70–79, 2002.
- [10] Bueno, E. M., B. Bilgen und G. A. Barabino: *Wavy-walled bioreactor supports increased cell proliferation and matrix deposition in engineered cartilage constructs*. Tissue Engineering, 11:1699–1709, 2005.
- [11] Bujia, J.: *Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen*. Laryngo-Rhino-Otol., (74):205–210, 1995.
- [12] Bujia, J., M. Sittinger, P. Pitzke, E. Wilmes und C. Hammer: *Synthesis of Human Cartilage Using Organotypic Cell Culture*. Laryngo-Rhino-Otol., (55):347–351, 1993.
- [13] Buschmann, M. D., Y. A. Gluzband, A. J. Grodzinsky, J. H. Kimura und E. B. Hunziker: *Chondrocytes in Agarose culture Synthesize a Mechanically Functional Extracellular Matrix*. Journal of Orthopaedic Research, 10:745–758, 1992.
- [14] Cancedda, R., B. Dozin, P. Giannoni und R. Quarto: *Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone*. Matrix Biology, 22:81–91, 2003.
- [15] Chesterman, P.J. und A. U. Smith: *Homotransplantation of Articular Cartilage and Isolated Chondrocytes*. The Journal of Bone and Joint Surgery, 50B(1):184–197, 1968.
- [16] Chia, S., K. Gorna, S. Gogolewski und M. Alini: *Biodegradable Elastomeric Polyurethane Membranes as chondrocyte Carriers for Cartilage Repair*. Tissue Engineering, 12(1):1945–1953, 2006.
- [17] Chung, C. und J. A. Burdick: *Engineering cartilage tissue*. Advanced Drug Delivery Reviews, 60:243–262, 2008.
- [18] Drury, J. L. und D. J. Mooney: *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. Biomaterials, 24:4337–4351, 2003.
- [19] Eyrich, D., F. Brandl, B. Appel, H. Wiese, G. Maier, M. Wenzel, R. Staundemaier, A. Goepferich und T. Blunk: *Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering*. Biomaterials, 28:55–65, 2007.

- [20] Fortier, L. A., G. Lust, H. O. Mohammed und A. J. Nixon: *Coordinate Up-regulation of Cartilage Matrix Synthesis in Fibrin Cultures Supplemented with Exogenous Insulin-like Growth Factor-i*. *Journal of Orthopaedic Research*, 17:467–474, 1999.
- [21] Franceschi, L. de, B. Grigolo, L. Roseti, A. Facchini, M. Fini, G. Giavaresi, M. Tschon und R. Giardino: *Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits*. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 75 A:612–622, 2005.
- [22] Freed, L. e., J. C. Marquis, G. Vunjak-Novakovic, J. Emmanuel und R. Langer: *Composition of Cell-Polymer Cartilage Implants*. *Biotechnology and Bioengineering*, 43:605–614, 1994.
- [23] Freemont, A.J. und J. Hoyland: *Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hayline cartilage: Its significance in cartilage repair and replacement*. *European Journal of Radiology*, 57:32–36, 2006.
- [24] French, M. M., J. Rose, J. Canseco und K. A. Athanasiou: *Chondrogenic Differentiation of Adult Dermal Fibroblasts*. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1):114–120, 2004.
- [25] Fukumoto, T., J. W. Sperling, A. Sanyal, J. S. Fitzsimmons, G. G. Reinholz, C. A. Conover und S. W. O Driscoll: *Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11:55–64, 2003.
- [26] Gaissmaier, C., J. Koh, K. Weise und J. Mollenhauer: *Future perspectives of articular cartilage repair*. *INJURY*, (3951):114–120, 2008.
- [27] Goessler, U., P. Bugert, K. Bieback, A. Baisch, T. Sadick, T. Verse, H. Klüter, K. Hormann und F. Riedel: *Expression of collagen and fiber associated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation*. *International Journal of Molecular Medicine*, 14:1015–1022, 2004.
- [28] Goessler, U., P. Bugert, K. Bieback, H. Sadick, A. Baisch, K. Hormann und F. Riedel: *In Vitro Analysis of Differential Expression of Collagens, Integrins, and Growth Factors in Cultured Human Chondrocytes*. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 134:510–515, 2008.

- [29] Goessler, U., J. Stern-Straeter, K. Riedel, G. Bran, K. Hörmann und F. Riedel: *Tissue engineering in head an neck reconstructive surgery: what type of tissue do we need?* Eur Arch Otorhinolaryngol, (264):1343–1356, 2007.
- [30] Grimaud, E., D. Heymann und F. Redini: *Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders.* Cytokine & Growth Factor Reviews, (13):241–257, 2002.
- [31] Haisch, A., O. Schultz, C. Perka, V. Jahnke, G.R. Burmester und M. Sittinger: *Tissue-engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel- und Polymeroliesstrukturen.* HNO, (44):624–629, 1996.
- [32] Hardingham, T., S. Tex und A. Murdoch: *Tissue engineering: chondrocytes and cartilage.* Arthritis Research, 4:63–68, 2002.
- [33] Hayflick, L.: *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.* Experimental Cell Research, 37:614–636, 1965.
- [34] Hwang, N. S., B. S. Shyni Varghese, Z. Zhang und J. Elisseeff: *Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells in Arginine-Glycine-Aspartate-Modified Hydrogels.* Tissue Engineering, 12:2695–2706, 2006.
- [35] Jiang, Y. Z., S. F. Zhang, Y. Y. Qi, L. L. Wang und H. W. Ouyang: *Cell Transplantation for Articular Cartilage Defects: Principles of Past, Present, and Future Practice.* Cell Transplantation, 20:593–607, 2011.
- [36] Johnstone, B., T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg und J. U. Yoo: *In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells.* Experimental Cell Research, 238:265–272, 1998.
- [37] Kang, Y., J. Yang, S. Khan, L. Anissian und G. A. Ameer: *A new biodegradable polyester elastomer for cartilage tissue engineering.* Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 77 A:331–339, 2006.
- [38] Kessler, M. W. und D. A. Grande: *Tissue engineering and cartilage.* Organogenesis, 4(1):28–32, 2008.

- [39] Kim, Y., R. Sah, J. Doong und A. Grodzinsky: *Fluorometric Assay of DNA in Cartilage Explants Using Hoechst 33258*. Analytical Biochemistry, Seiten 168–176, 1988.
- [40] Lee, K. H., S. U. Song, T. S. Hwang, Y. Yi, I. S. Oh, J. Y. Lee, K. B. Choi, M. S. Choi und S. Kim: *Regeneration of Hyaline Cartilage by Cell-Mediated Gene Therapy Using Transforming Growth Factor β 1 - Producing Fibroblasts*. Human Gene Therapy, 12:1805–1813, 2001.
- [41] Ma, Z., M. Kotaki, R. Inai und S. Ramakrishna: *Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds*. Tissue Engineering, 11:101–109, 2005.
- [42] Mark, K. von der, V. Gauss, H. von der Mark und P. Müller: *Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture*. Nature, 267:531–532, 1977.
- [43] Marlovits, S., P. Zeller, P. Singer, C. Resinger und V. Vecsei: *Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation*. European journal of Radiology, 57:24–31, 2006.
- [44] Martin, I.: *Züchtung von dreidimensionalen Knorpeltransplantaten*. PRAXIS, 95:841–844, 2006.
- [45] Martin, I., G. Vunjak-Novakovic, J. Yang, R. Langer und L. E. Freed: *Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue*. Experimental Cell Research, 253:681–688, 1999.
- [46] Mauck, R.L., C.C B. Wang, E.S. Oswald, G.A. Ateshian und C.T. Hung: *The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading*. Osteoarthritis and Cartilage, 11:879–890, 2003.
- [47] Melero-Martin, J.M. und M. Al-Rubeai: *In Vitro Expansion of Chondrocytes*. Topics in Tissue Engineering, 3:879–890, 2007.
- [48] Miralles, G., R. Baudoin, D. Dumas, D. Baptiste, P. Hubert, J. F. Stoltz, E. Dellacherie, D. Mainard, P. Netter und E. Payan: *Sodium alginate sponges*

with or without sodium hyaluronate: In vitro engineering of cartilage. Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 57:115–124, 2001.

- [49] Mooney, D. J., C. L. Mazzoni, C. Breuer, K. McNamara, D. Hern, J. P. Vacanti und R. Langer: *Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering.* Biomaterials, 17:115–124, 1996.
- [50] Mow, V., C. Wang und C. Hung: *The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage.* Osteoarthritis and Cartilage, 7:41–58, 1999.
- [51] Mueller, M.B., T. Blunk, B. Appel, A. Maschke, A. Goepferich, J. Zellner, C. Englert, L. Prantl, R. Kujat, M. Nerlich und P. Angele: *Insulin is essential for in vitro chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and influences chondrogenesis in a dose-dependent manner.* International Orthopaedics, 37:153–158, 2013.
- [52] Mulisch, M. und U. Welsch: *Romeis Mikroskopische Technik.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010. 18. Auflage.
- [53] Nawata, M., S. Wakitani, H. Nakaya, A. Tanigami, T. Seki, Y. Nakamura, N. Saito, K. Sano, E. Hidaka und K. Takaoka: *Use of Bone Morphogenetic Protein 2 and Diffusion Chambers to Engineer Cartilage Tissue for the Repair of Defects in Articular Cartilage.* Arthritis & Rheumatism, 52:155–163, 2005.
- [54] Nettles, D. L., S. H. Elder und J. A. Gilbert: *Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering.* Tissue Engineering, 8:1009–1016, 2002.
- [55] Nuernberger, S., N. Cyran, C. Albrecht, H. Redl, V. Vecsei und S. Marlovits: *The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts.* Biomaterials, 32:1032–1040, 2011.
- [56] Park, Y., M. Sugimoto, A. Watrin, Chiquet M. und Hunziker E. B.: *BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel.* OsteoArthritis and Cartilage, 13:527–536, 2005.

- [57] Pei, M., J. Seidel, G. Vunjak-Novakovic und L.E. Freed: *Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294:149–154, 2002.
- [58] Rotter, N., A. Haisch und M. Bücheler: *Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery*. Eur Arch Otorhinolaryngol, (262):539–545, 2005.
- [59] Rotter, N., Aigner J., A. Naumann, H. Planck, C. Hammer, G. Burmester und M. Sittinger: *Cartilage reconstruction in head and neck surgery: Comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage*. Journal of biomedical materials research, (42):347–356, 1998.
- [60] Rudert, M. und C.J. Wirth: *Knorpelregeneration und Knorpelersatz*. Der Orthopaede, 27:309–321, 1998.
- [61] Saini, S. und T.M. Wick: *Concentric Cylinder Bioreactor for Production of Tissue Engineered Cartilage: Effect of Seeding Density and Hydrodynamic Loading on Construct Development*. Biotechnology Progress, 19:510–521, 2003.
- [62] Schnabel, M., S. Marlovits, G. Eckhoff, I. Fichtel, L. Gotzen, V. Vecsei und J. Schlegel: *Osteoarthritis and Cartilage*. Journal of the OsteoArthritis Research Society International, 10:62–70, 2002.
- [63] Silverman, R. P., D. Passaretti, W. Huang, M. A. Randolph und M. J. Yaremchuk: *Injectable Tissue-Engineered Cartilage Using a Fibrin Glue Polymer*. Plastic and Reconstructive Surgery, 103:1809–1818, 1999.
- [64] Solursh, M.: *Formation of Cartilage Tissue In Vitro*. Journal of Cellular Biochemistry, 45:258–260, 1991.
- [65] Staudenmaier, R., T.N. Hoang, N. Kleinsasser, C. Schurr, K. Fröhlich, M.M. Wenzel und J. Aigner: *Flap Prefabrication and Prelamination with Tissue-Engineered Cartilage*. Journal of Reconstructive Microsurgery, 20:555–564, 2004.
- [66] Temenoff, J. S. und A. G. Mikos: *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage*. Biomaterials, 21:431–440, 2000.

- [67] Vats, A., R. C. Bieibly, N. Tolley, S. C. Dickinson, A. R. Boccaccini, A. P. Hollander, A. E. Bishop und J. M. Polak: *Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells: The Effect of the Micro-Environment*. Tissue Engineering, 12(6):1687–1697, 2006.
- [68] Vickers, S. M., L. S. Squitieri und M. Spector: *Effects of Cross-linking Type ii Collagen-GAG Scaffolds on Chondrogenesis In Vitro: Dynamic Pore Reduction Promotes Cartilage Formation*. Tissue Engineering, 12(5):1345–1355, 2006.
- [69] Vinatier, C., D. Magne, A. Moreau und O Gauthier: *Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel*. Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 80 A:66–74, 2006.
- [70] Watt, F.M.: *Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture*. Journal of Cell Science, 89:373–378, 1988.
- [71] Welsch, U.: *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer bei Elsevier, München, 2006. 2. Auflage.
- [72] Wert, G. de und C. Mummery: *Human embryonic stem cells: research, ethics and policy*. Human Reproduction, 18:672–682, 2003.
- [73] Woodfield, T.B.F., J. M. Bezemer, C.A. van Blitterswijk und J. Riesle: *Scaffolds for Tissue Engineering of Cartilage*. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 12(3), 2002.
- [74] Yaeger, P.C., T.L. Masi, J.L. Buck de Ortiz, F. Binette, R. Tubo und J.M. McPherson: *Synergistic Action of Transforming Growth Factor- β and Insulin-like Growth Factor-Induces Expression of Type ii Collagen and Aggrecan Genes in Adult Human Articular Chondrocytes*. Experimental Cell Research, 237(EX973781):318–325, 1997.
- [75] Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz und M. H. Hedrick: *Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies*. Tissue Engineering, 7(2):211–228, 2001.