

**Aus der Hals- Nasen- Ohrenklinik und Poliklinik
Des Klinikum rechts der Isar
der TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Erstellt unter der Leitung von:
Herrn apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier

**Untersuchung zur Präfabrizierten Neovaskularisation von
Tissue Engineering Konstrukten
im Mausmodell**

Inaugural- Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

vorgelegt von

Veronika Mandlik
München 2011

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Aus der Hals- Nasen- Ohrenklinik und Poliklinik
Des Klinikum rechts der Isar**

Untersuchung zur Präfabrizierten Neovaskularisation von Tissue Engineering Konstrukten im Mausmodell

Veronika E.M. Mandlik

Vollständiger Ausdruck 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. Dr. K.-D. Wolff
3. Univ.- Prof. Dr. H.-G. Machens

Die Dissertation wurde am 09.06.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.11.2011 angenommen.

*Meinem Vater Dr. med. Wolfgang Mandlik
und dem Andenken meines Großvater Dr. med. Richard Mandlik
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

*„Es leuchtet seht! - Nun läßt sich wirklich hoffen,
Daß, wenn wir aus viel hundert Stoffen
Durch Mischung - denn auf Mischung kommt es
an –
Den Menschenstoff gemächlich komponieren,
In einen Kolben verlutieren
So ist das Werk im stillen abgetan.*

*Es wird! die Masse regt sich klarer!
Die überzeugung wahrer, wahrer:
Was man an der Natur Geheimnisvolles pries,
Das wagen wir verständig zu probieren,
Und was sie sonst organisieren ließ,
Das lassen wir kristallisieren.“*

Johann Wolfgang von Goethe: *Faust II*, 1832, Zweiter Akt, Laboratorium

1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	3
2.1	Tissue Engineering Definition	3
2.1.1	Historie und status quo des Tissue Engineering	4
2.1.2	Visionen – Problematik und Lösungsversuche	6
2.1.3	Biomaterialien/ Scaffolds	10
1.2	Neovaskularisation	14
2.2.1	Vaskulogenese	14
2.2.2.	Angiogenese.....	15
2.3	Lappen- Präfabrikation.....	16
2.3.1.	Historie und status quo der Lappenpräfabrikation	16
2.4	Knorpelgewebe	18
2.4.1.	Zellursprung und Differenzierung.....	19
2.4.2.	Morphologie und Funktion	20
2.4.3.	Knorpelassoziierte Pathologie	23
2.4.4.	Tissue Engineering von Knorpelzellen - Zellquelle, Scaffolds und Zellkultur	25
3.	Eigene Untersuchungen.....	32
3.1.	Fragestellung und Zielsetzung.....	32
3.2	Studienkonzept und Versuchsgruppen	32

4.	Material und Methoden.....	34
4.1	Versuchstiere – Pflege und Haltung	34
4.2.	Konstrukte.....	35
4.2.1.	Spendermaterial für Humane und Bovine Chondrozyten.....	35
4.2.2.	Chondrozyten - Isolation und Expansion	36
4.2.3	Die Polyurethan-Leitschiene	37
3.2.3.1	Herstellung / Eigenschaften	38
4.2.4	Zell-Konstrukt-Herstellung bzw. Befüllung und Kultivierung des Biomaterials	38
4.2.5.	Zellvitalitätstest	40
4.3.	Operatives Vorgehen	40
4.3.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung.....	41
4.3.2.	Operationstechnik und Nachsorge.....	42
4.3.3.	Euthanasie der Tiere mit Konstrukt-Explantation/Nachbereitung.....	46
4.4.	Methoden der Auswertung.....	46
4.4.1	Makroskopie	46
4.4.2	Mikroskopie/ Histologie	47
4.4.3	Statistische Analysen.....	54
5.	Ergebnisse	55
5.1	Biokompatibilität <i>in vitro</i> und Besiedlungsmuster.....	55

5.2	In-vivo Versuchsablauf.....	55
5.2.1	Implantation und postoperative Beobachtungszeit:	55
5.2.2	Komplikationen und Ausfälle.....	56
5.3	Makroskopie:	57
5.4.	Mikroskopie/Histologie	60
5.5.	Statistische Auswertung.....	69
6.	Diskussion.....	80
6.1.	Allgemeine Problemdarstellung:	81
6.2.	Hypothesenmodell und Ziel der Arbeit	81
6.2.1.	Präfabrikation.....	81
6.2.2.	In vivo Verweildauer	81
6.2.3.	Das Mausmodell	84
6.2.4.	Zwei vaskuläre Konfigurationen: Durchfluss versus Ligatur als Loop- Äquivalent.....	86
6.2.5.	Gewebeentwicklung:.....	87
6.2.5.1.	Entzündungsreaktion	89
6.2.5.2.	Spontane Adipogese im unbesiedelten Implantat	90
6.2.5.3.	Knorpelgenerierung trotz Isolation	90
6.2.5.4.	Gewebegeneration innerhalb des Implantates: Zentral versus Peripher.	91
6.3.	Ausblick und Perspektive:.....	91
6.3.1.	Alternative Biomaterialien	91

6.3.2.	Die Kombination von Tissue Engineering und Lappenpräfabrikation im klinischen Alltag	93
6.3.3.	Chirurgisches Handling präfabrizierter Tissue Engineerter Konstrukte...	94
6.3.4.	Fazit.....	96
7.	Zusammenfassung.....	97
8.	Literaturverzeichnis	100
9.	Abkürzungsverzeichnis	116
10.	Anhang.....	117
10.1.	Danksagung.....	117
10.2	Lebenslauf	119

1. Einleitung

Der rekonstruktiv-chirurgische Goldstandard für die Behandlung von Gewebedefekten mit Substanzverlust besteht aktuell im Einsatz autogener, allogener oder prothetischer Materialien, bzw. einer Kombination daraus. Gerade das Therapieregime autogener Transplantate ist jedoch aufgrund begrenzter Verfügbarkeit, nicht selten erheblicher Hebedefektmorbidität und mitunter mangelhafter Materialqualität eingeschränkt. Verschiedene therapeutische Ansätze wurden bereits entwickelt, um die aufgeführten Probleme zu umgehen. Trotzdem existiert bis heute keine wertvolle Alternative: beispielsweise ist das Angebot allogener Transplantate um ein Vielfaches geringer als die Nachfrage; hinzu kommt das ungelöste Risiko der Infektionsübertragung sowie eine zusätzlich limitierende immunologische Komponente.

Das Streben nach einer weiteren Verbesserung der Operationsergebnisse, Reduktion der Risiken und Schmerzen für die Patienten, Vereinfachung der Operationstechnik sowie eine Verringerung des intraoperativen Aufwandes bedingen die Überlegungen zum Wandel der Technik durch wissenschaftliche Neuentwicklungen.

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die „Regenerativen Medizin“ damit, innovative Strategien verschiedener wissenschaftlicher Gebiete zu kombinieren, um Gewebedefekte erfolgreich rekonstruieren zu können. Ein möglicher Ansatz ist das so genannte Tissue Engineering, welches sich mit der Herstellung zellulär besiedelten Gewebekonstrukte beschäftigt.

Durch das Tissue Engineering von Knorpel ist es beispielsweise möglich, aus kleinen Biopsien größere Mengen an autologem Knorpelgewebe zu kultivieren, um entsprechende Defekte zu rekonstruieren.

Zudem existieren diverse Möglichkeiten, defektgerechte Zellträger in Leitschienenfunktion mit, von Patienten gewonnen Zellen zu besiedeln. Das Ziel wäre der allmähliche Abbau des Biomaterials in reziprokem Verhältnis zum vollständigen Ersatz, bzw. der Etablierung mit und durch autologes zu rekonstruierendes Gewebe, wie beispielsweise Knorpel.

Als konkretes Beispiel diese Prinzips sollte es demnach denkbar sein, ein Ohrmuschelskelett aus Knorpel zu züchten und einem Patienten zu implantieren.

Klarer Vorteil im Vergleich zur Verwendung von alloplastischen Materialien ist die fehlende Immunreaktion mit Entzündung, Resorption oder Extrusion des Implantates. Abgesehen davon steht autologes Knorpelgewebe nur in begrenztem Maße zur Verfügung und besitzt nachgewiesenermaßen kaum bis gar keine Fähigkeit zur Regeneration. Des Weiteren ist die Hebedefekt morbidity für den Patienten durch kleine Knorpelbiopsien vernachlässigbar, ähnlich wie das sinkende Risiko durch die Abnahme der Operationszeit. Trotzdem hat aufgrund diverser Limitationen diese Technik bisher noch nicht den Einzug in den klinischen Alltag geschafft.

Es hat sich gezeigt, dass Tissue Engineertes Gewebe ab gewissen Dimensionen mangels initial fehlendem versorgendem vaskulären System nach erfolgreicher in vitro Multiplikation und erfolgreichem Einbringen in einen Organismus untergeht, da eine Versorgung via Diffusion nur über geringe Strecken von wenigen Millimetern gewährleistet wird (Folkman J 1973). Diverse Lösungsstrategien wurden entwickelt, unter anderem der Versuch die intrinsische Gefäßversorgung im Tissue Engineering Konstrukt durch einen eigenen Gefäßstiel zu forcieren, d.h. die Tissue Engineering Leitschiene zu präfabrizieren.

Diesbezüglich konnten allen voran präklinische, experimentelle Tiermodelle diese Methode des Tissue Engineering in Kombination mit der Präfabrikation auf den derzeitigen Stand der Forschung bringen: da sich nur im Tiermodell das Ersatzmaterial am Gefäßstiel orthotop testen lässt, ist zu behaupten, dass das Tiermodell als Bindeglied zwischen Labor und Klinik fungiert.

Aufgrund der Größenverhältnisse im Bezug auf die Komponente Präfabrikation mit Gefäßbündel existieren in der Literatur bereits zahlreiche Modelle in Ratte, Kaninchen und größeren Versuchstieren; auf diesem Sektor ist die Maus, trotz ihrer Vorteile bis dato nicht in Führung als wissenschaftliches „workhorse“.

Dementsprechend bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, ein einfach durchführbares, kostengünstiges und zeitlich akzeptables Modell zur Testung präfabrizierter Tissue Engineering Konstrukte in der Maus zu etablieren; dessen Versuchsergebnisse galt es schließlich nach optimierter praktischer Durchführung mit den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen in anderen Tiermodellen zu vergleichen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Tissue Engineering Definition

Eine der ältesten und zahlreich zitierten Definitionen lautet: „Tissue Engineering bedeutet die Anwendung von Technik und Naturwissenschaft für ein grundlegendes Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehung normaler, sowie pathologisch veränderter Gewebe und die Entwicklung biologischer Substitute, um Gewebefunktionen wiederherzustellen, aufrecht zu erhalten oder zu verbessern“. Langer und Vukantich ergänzten diese Definition wenig später um die Schlagworte „Interdisziplinarität und Life-Science“ (Langer R 1993). Was sich dahinter konkret verbirgt erklärt unter anderem das Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices (SCMPMD) der Europäischen Kommission „DG SANCO“: „Tissue Engineering ist die Regeneration biologischen Gewebes durch die Anwendung von Zellen unter Zuhilfenahme supportiver Strukturen (IPTS 2003).“

Die Grundbestandteile dieser Wissenschaft „Zelle, Leitschiene und bioaktive Moleküle“ (z.B. Wachstumsfaktoren)

werden für diesen Zweck auf unterschiedlichste Weise kombiniert, um vitalisierte, Tissue Engineering Produkte zu generieren (Abb. 1).

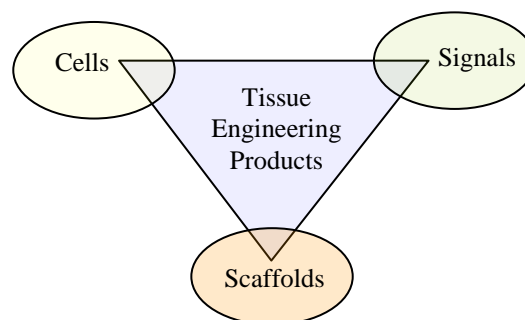


Abb.1:
Die Elemente des Tissue Engineering (Lefebvre V 1997; Hiles M 2006)

Der klinische Gedanke hinter der engen Zusammenarbeit zwischen den Wissenschaftlern unterschiedlichster Gebiete (Abb. 2) geht auf den großen Bedarf an Ersatzmaterialien z.B. für Muskel, Knochen, Knorpel, Fettgewebe, periphere Nerven, oder ganze Organsysteme zur Rekonstruktion diverser Defekte zurück. Synonym für

den Term „Tissue Engineering“ findet sich seit einiger Zeit auch der Begriff „Regenerative Medizin“, im engerem Sinne liegt hierbei der Schwerpunkt auf der Komponente Stammzell-Technologie (Abb. 2).

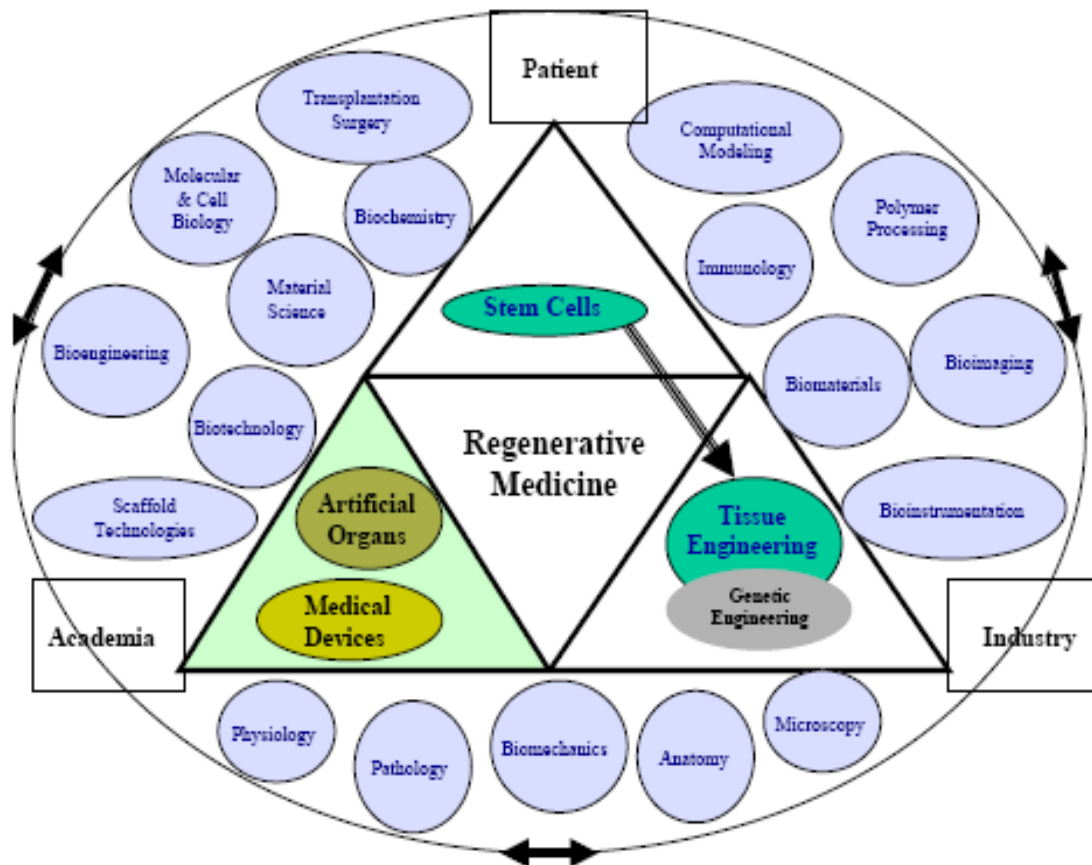


Abb. 2:

Komplexe Multidisziplinarität des Tissue Engineering im Kontext der Regenerativen Medizin.

2.1.1 Historie und status quo des Tissue Engineering

Eine der ältesten Fantasien der Menschheit beschäftigt sich mit der Herstellung vitalen Gewebes bis hin zu lebendigen Kreaturen. Zeugnisse dafür finden sich in Relikten aus Wissenschaft, Kunst und Literatur vergangener Jahrhunderte. Man denke an die Erschaffung der Eva aus Adams Rippe, an den Mythos um Aphrodite, die aus einer Statue des Bildhauers Pygmalion erwachte oder den ersten Akt in Faust II, in dem Bezug genommen wird auf ein Rezept des mittelalterlichen

Alchemisten Paracelsus zur Kreation eines Homunculus (Schultheiss D 2000). Dieser kurze historische Streifzug zeigt, dass man, exzentrisch gedacht, die Ursprünge des „Tissue Engineering“ weit in die Vergangenheit zurückverfolgen könnte.

Die Geschichte des Tissue Engineering als Wissenschaft wird in den 60er Jahren greifbar: Materialwissenschaften und Zellbiologie wurden kombiniert, noch ohne dabei von Tissue Engineering zu sprechen. Eine der ersten Referenzen zum Begriff Tissue Engineering erschien schließlich 1984 im Rahmen von Korneaersatz-Prothesen (Atala A 2000). Vier Jahre später fand der erste Kongress unter dem Motto Tissue Engineering in Lake Tahoe, Kalifornien statt und im Jahr 2002 wurde „Tissue Engineering“ schließlich als „medical subject heading“ von der National Library of Medicine eingeführt. Das Konzept schien revolutionäres Potential für neue Therapieansätze zu versprechen; große Hoffnungen wurden durch optimistische

Voraussetzungen geweckt (Chapekar MS 2000; Griffith LG 2002) und schnell kam es zu ersten klinischen Anwendungen und Züchtungsversuchen ganzer Ohrmuscheln oder Finger (Isogai N 1999; Vacanti CA 2001). Die Gründung der Tissue Engineering Society und des Journal of Tissue Engineering in den Jahren 1995 und 1996 ging einher mit einem euphorischen Wachstum an Forschung und Wissenschaft sowohl an Universitäten, als auch an eigens für das Gebiet etablierten Forschungszentren und Firmen (Abb. 3). Große Erfolge blieben trotz Investitionen in Höhe mehrerer Milliarden US-Dollar für



Abb. 3:

Hysterie um das Tissue Engineering spiegelte sich auch in einem Artikel des TIME magazines der Ausgabe 22. Mai 2000 über die „Visions of th 21st century“ wieder: „Tissue Engineers“ führen darin die Rangliste der „10 hottest jobs“ des 21. Jahrhunderts an.

die primär unrealistisch propagierten Zeitrechnungen jedoch aus. Bis heute findet Tissue Engineertes Material keine breite klinische und kommerzielle Anwendung, die noch ungelösten Probleme der „of the shelf availability, cell source, matrix and immune acceptance“ sind noch zu groß (Ahsan T 2005). Trotzdem ist diese Periode als Gewinn anzusehen; es wurde viel Erfahrung gesammelt und vereinzelt klinisch anwendbare Produkte, wie zum Beispiel Haut- oder Knochenersatz (Pomahac B 1998; Schimming R 2004) entwickelt. Letztlich sah man ein, dass die Lücken im Bereich der Grundlagenforschung noch groß sind und es einer multidisziplinären Zusammenarbeit bedarf, um Ziele auf dem Gebiet des Tissue Engineering zu erreichen (Nerem RM 2006). Heute sind im Entwicklungsprozess zudem Zell- und Molekularbiologen, Ingenieure für Robotertechnik oder Bioreaktoren, Pharmazeuten und viele andere Spezialisten involviert. Ständig entstehen neue Verfahren, wie z.B. Computer Aided Design (CAD), die als kleine Meilensteine auf dem Weg zum Gewebersatz für den Patienten zu sehen sind.

2.1.2 Visionen – Problematik und Lösungsversuche

Die Idee hinter dem Konzept TE geht auf den großen Bedarf an Ersatzmaterialien zurück, traumatisch bedingte, angeborene oder pathologisch veränderte Defekte zu versorgen. Aus dem derzeitigen state of the art der Rekonstruktiven Chirurgie ist die Verwendung prothetischer Implantate aus Silikon, Titan, Polyethylen etc. nicht mehr wegzudenken, geht jedoch stets mit Risiken wie Fremdkörperreaktion, Protrusion oder Material-Ermüdung einher. Zum anderen wird allogenes oder autologes Ersatzgewebe heute routiniert eingesetzt. Letzteres aus qualitativen oder quantitativen Gründen meist nur in limitiertem Umfang und entsprechendem Preis: Hebedefekt-Morbidität, ästhetische Einbußen und eine aufwendige Eingriffs-Prozedur (Schnurer SM 2003). Das Ungleichgewicht zwischen Spenderkapazität und Bedarf an allogenen Material scheint sich in den letzten Jahren zu vergrößern und Lösungen für die damit verbundene immunologische Komponente oder Infektionsgefahr stehen weiterhin aus. Mit diesen Therapien lassen sich trotz allem hervorragende Ergebnisse erzielen; aber auch unter wirtschaftlichem Aspekt gilt zu bedenken, dass gerade der Verlust von Organen oder Geweben einer der kostenintensivsten Punkte des Gesundheitssystems ist. Tissue Engineerer haben die

Vision, die Rekonstruktive Medizin mittels in vitro Herstellung von fast allen menschlichen Geweben zu evolutionieren. Das in vitro hergestellte Konstrukt soll nach der Implantation zunächst mechanische Aufgaben übernehmen und schließlich im Rahmen des Remodelling resorbiert werden, während gleichzeitig neues Gewebe gebildet wird. Es gewährt lebenslange Haltbarkeit, adäquate mikroskopische und makroskopische Anatomie, mechanische Belastbarkeit und uneingeschränkte Funktion. Dieses Ziel bedeutet Lösungen zu finden für zahlreiche Probleme, die bereits bei der Auswahl der Zelle beginnen. Greift man zum Beispiel für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe auf isolierte Chondrozyten, Progenitorzellen oder differenzierte Stammzellen zurück? Die Applikation von Stammzellen ist beispielsweise mit Bedenken über unkontrollierte Mutationen, bzw. Proliferation und Tumorgenese verbunden (Ciorba A 2006). Weiter ist zu überlegen, aus welchem Biopsiematerial die Ziel-Zellen selektioniert werden und ob mit autologen, allogenen oder xenogenen Zellen gearbeitet werden soll (Nerem RM 2006)? Schließlich stellt die Expansion geeigneter Zelltypen eine Herausforderung dar, genau wie die Kunst, auserwählte Zellen räumlich zu organisieren. Neben der zweidimensionalen Zellkultur besteht z.B. mittlerweile die Möglichkeit Zellen mit einem dynamischen System (Bioreaktor) auf dreidimensionalen Biomaterialien zu kultivieren (Horch RE 2006)? Hutmacher et al. beschreiben beispielsweise für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe die Kontrolle der Redifferenzierung dedifferenzierter Zellen während der Zell-Amplifikation als größte Schwierigkeit in der Regeneration nicht nur strukturellen, sondern auch funktionalen Gewebes (Hutmacher DW 2003). Und wie kann die Differenzierung nicht invasiv während der Kultur gemessen werden? Für die Anwendung von Wachstumsfaktoren gilt: Welche Faktoren können in welcher Konzentration appliziert werden, um bestimmte Effekte in vitro und/oder in-vivo zu erzielen oder vermeiden? Dass auch die Anforderungen an die Leitschienen sehr hoch sind, wird deutlich, wenn man sich die Liste an Voraussetzungen vor Augen führt, die ein Scaffold für den Einsatz auf diesem Gebiet erfüllen muss (Details siehe Punkt 2.1.3). Als Beispiel für eine innovative Lösungsstrategie in puncto individuelle Passgenauigkeit sei hier das Computer Aided Design (CAD) genannt, welches Datensätze aus der Radiologie für die Produktion individueller Implantate konvertiert. Die Situation in-vivo wurde bisher noch nicht angesprochen und birgt ebenfalls diverse Risiken. Die Gefahr besteht, dass die Material-Degradation ausbleibt, zu

schnell einsetzt oder unter Umständen zu Serombildung führt (Hiles M 2006). Als Manko gilt auch die Tatsache, dass Gewebe nur über eine Distanz von wenigen Millimetern (Cassell OC 2002) per Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, was Vitalität oder Funktion der zentral in größeren Scaffolds gelegenen Zellen stark beeinträchtigt. Mehrere Lösungsansätze, kategorisierbar in *in vitro* und *in vivo* Strategien, wurden bisher

ausgearbeitet (Abb. 4). Der „*In-vitro*“ Ansatz geht davon aus, dass eine räumlich und zeitlich kontrollierte Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren, wie VEGF, FGF-2, oder PDGF- β während der Konstruktentwicklung ein permanentes mikrovaskuläres Netzwerk generiert (Kano MR 2005; Rophael JA 2007). In der Literatur findet sich außerdem das Konzept der Addition von Zell-Komponenten, wie z.B. Endothelzellen aus Gefäßwänden (Jain RK 2005). Betrachtet man hingegen die Schiene des *in-vivo* Engineering einer Mikrozirkulation im Konstrukt, existieren ein extrinsischer, sowie ein intrinsischer Ansatz: via Kapillareinsprossung aus dem Empfängerbett können Gewebe, aus oben beschriebenen Limitationen der Diffusion allerdings nur mit 2 – 3mm Dicke extrinsisch, vaskularisieren. Das Prinzip der „intrinschen *in-vivo* Vaskularisation“ hingegen stellt einen direkten Kontakt zwischen einer vollständig ausgebildeten Arterie und/oder Vene und dem Konstrukt her; von dem Ausgangsgefäß setzt folglich eine Spontan-Angiogenese in das Konstrukt ein, was im Sinne der Präfabrikation (Details siehe Punkt 2.3.) steht.

Andere Arbeitsgruppen beschäftigen sich direkt mit der Entwicklung engineerter Blutgefäße und applizieren beispielsweise Endothelzellen auf tubuläre Leistrukturen (Levenberg S 2005); der Stand dieser engineerter Blutgefäße bezüglich Struktur und physiologischer Funktion ist allerdings fraglich (Jain RK 2005). Abgesehen von diversen praktischen „Hürden“ werden potentielle ethische Limitationen oft nicht erwähnt. Stammzellen gewinnen auch im Tissue Engineering an Bedeutung und viele Begriffe im Zusammenhang mit Tissue Engineering (Regenerative Medizin, Bio-engineering, Life Science) wecken Assoziationen in Anlehnung an die fortwährende, internationale Debatte um den Einsatz von Stammzellen und eine mögliche Überschreitung ethischer Grenzen (Ciorba A 2006). Den Stand der Forschung transparent zu halten und angemessene Öffentlichkeitsarbeit zu leisten, so dass jegliche politische und/oder juristische Formulierung nach eingehender wissenschaftlicher Aufklärung getroffen wird, gehört ebenfalls zu Hürden im Tissue Engineering

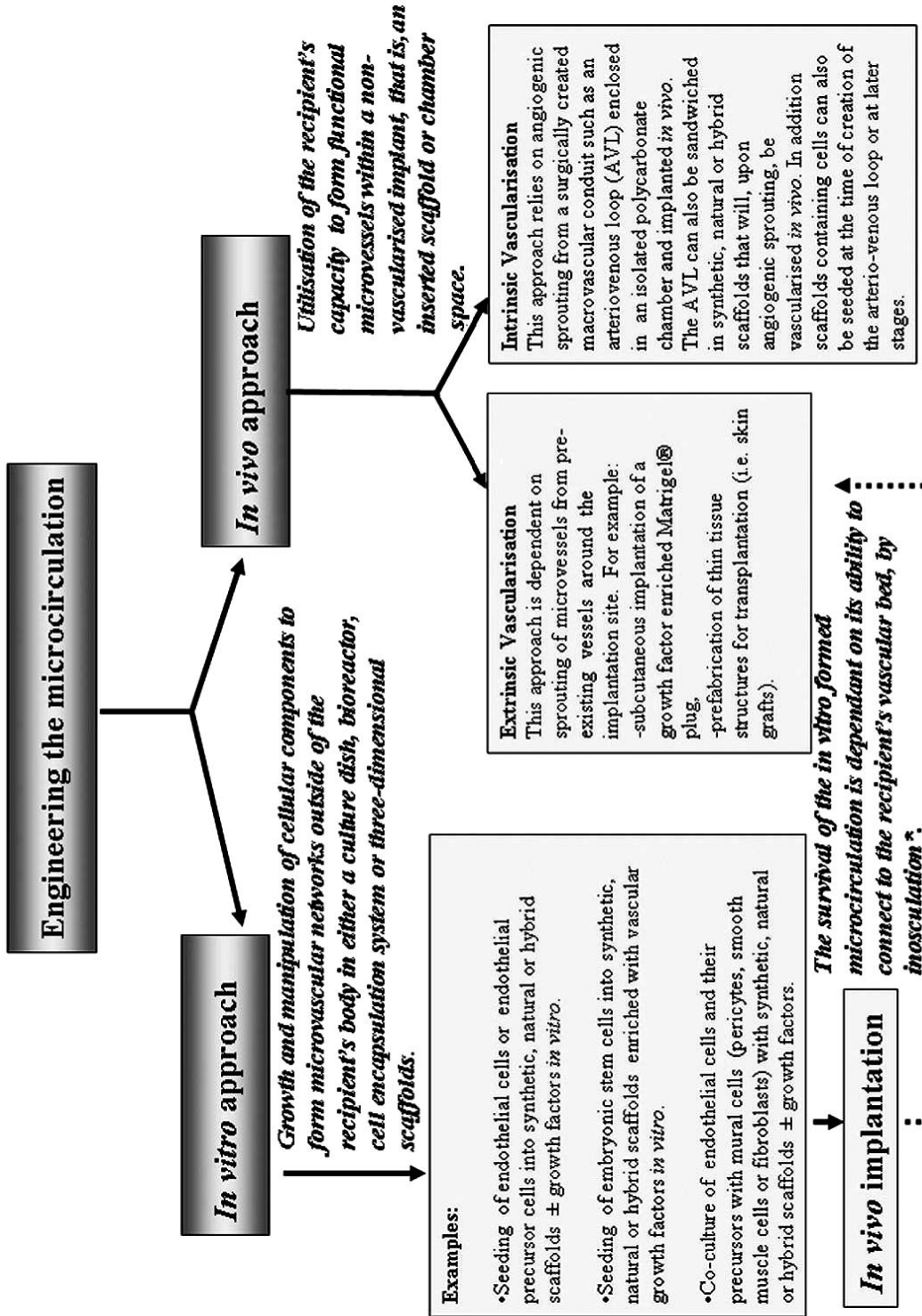


Abb. 4:
 Diagramm von Lokmic et al. (Lokmic Z 2008) über Ansätze, ein Gefäßsystem im TE Konstrukt zu generieren.
 Unter *Inosculation wird die aktive Verbindung zwischen Implantat und Empfänger-gefäßen verstanden.

2.1.3 Biomaterialien/ Scaffolds

Biomaterialien spielen im Tissue Engineering eine bedeutende Rolle als Implantate. Im Gegensatz zu herkömmlichen Implantaten (Herzschrittmacher, Gelenkersatz, Gefäßprothese etc.) besitzen Biomaterialien eine retikuläre Struktur mit großem Oberflächen-Volumen Verhältnis. Während der initialen Zellbesiedelung gewährleisten sie die Diffusion von zellulären Metaboliten und Sauerstoff, dienen in der Phase der Gewebeformation als dreidimensionale Schablone und definieren im Sinne eines „Platzhalters“ den zu rekonstruierenden Raum. Schließlich bestimmt das Design der Leitschienen die endgültige Form des neu entstehenden Gewebes. Von ihrer Funktion als Stütze für Anheftung, Proliferation und die Funktion der Zellen leitet sich die ebenfalls gängige Bezeichnung Scaffold (engl. das Gerüst) ab. Dass die Qualität des engeneerten Gewebes in vielerlei Hinsicht unter dem Einfluss des Trägermaterials steht wird offensichtlich (Ciorba A 2006) , betrachtet man die Kriterien (Moroni L 2008), die scaffolds im Idealfall erfüllen, um im Tissue Engineering eingesetzt werden zu können:

Anforderungen:

- *Biokompatibilität:*

Die Freisetzung von Substanzen sollte nur in nicht-toxischen Konzentrationen stattfinden, um das Ausbleiben einer immunologischen, bzw. einer klinisch detektierbaren primären oder sekundären Fremdkörperreaktion zu garantieren. Zu bedenken gilt, dass es als natürliche Folge von Wundheilungsprozessen auch bei biokompatiblen Implantaten initial zur Entzündungsreaktion kommt; diese ist im Idealfall klinisch stumm, bzw. gut therapierbar (Hiles M 2006). Weniger gängige Definitionen sehen Implantatoberflächen dann als biokompatibel, wenn die Körperzelle sie nicht nur toleriert, sondern als körpereigen erkennt (Ratner BD 1993); oder sie sehen Biokompatibilität sogar als Zusammenspiel aus Qualität der Operation, Eigenschaften des Patienten und Biokompatibilität des Materials (Williams D 2007)

- *Biodegradabilität und/ oder Bioresorbierbarkeit:*

Degradation bzw. Resorption sollten in kontrollierbarem Grad stattfinden und in vitro und in-vivo auf Zell- und Gewebewachstum abgestimmt sein. In engerem Sinn

handelt es sich bei Biodegradation um eine Materialauflösung durch Makromolekulare Einwirkung mit in-vivo Dispersion. Im Gegensatz dazu steht die Resorption für die totale in-vivo Elimination degradiertes Elemente über natürliche Stoffwechselwege. Genannte Begriffe sind nicht zu verwechseln mit den Eigenschaften Bioabsorbierbarkeit (Material-Löslichkeit in Körperflüssigkeiten) und Bioerodierbarkeit (Oberflächen-Degradation mit anschließender Resorption) (Vert M 1992; Vert M 2009).

- *Mechanische Formstabilität:*

Diese sichert eine dreidimensionale Unterstützung für Zell-Entwicklung und Expansion und sollte den Anforderungen des Empfängerareals standhalten können. Im Idealfall besitzt das Biomaterial die gleichen elastomechanischen Eigenschaften wie das zu ersetzende Gewebe.

- *Physikalisch- chemische Kompatibilität:*

Das Material muss eine uniforme Zellverteilung garantieren und darf keinen unkontrollierbaren Einfluss auf den Phänotyp der Zellen nehmen. Seit langem ist bekannt, dass das Verhalten von Zellen auf Biomaterialien in enger Beziehung zu deren physikalischen und chemischen Eigenschaften steht (Lydon MJ 1985). Während die physikalische Struktur, bzw. Architektur der Leitschiene Nährstoff-Diffusion, sowie Zell-Zell Interaktion bestimmt (Zeltinger J 2001), nimmt die Oberflächenchemie Einfluss auf Zell-Adhäsion, Zell-Morphologie und daraus resultierende Zell-Aktivität, da sie wesentlich am molekularen Austausch mit der Umgebung (z.B. Kulturmedium) beteiligt ist. So lassen sich heute in der Implantat-Produktion chemische (bezüglich Oberflächen-Benetzbarkeit, Protein-Adsorption oder Quellverhalten), sowie physikalische Feineinstellungen treffen: Änderungen im Herstellungsverfahren können beispielsweise die Architektur im Scaffold verändern (Malda J 2005) und somit Einfluss auf Geometrie, Größe, Interkonnektivität und Ausrichtung der Poren nehmen.

- *leicht implantierbar* mit anschließender *Autointegration* innerhalb des Empfängerbettes.

- *möglichst unaufwendig und kostengünstig in der Produktion* und dabei noch individuell in Größe und Form variabel

Einteilung

Angesichts der Vielzahl experimentell oder klinisch untersuchter Scaffold-Materialien existieren diverse Klassifikationen. Eine gängige Kategorisierung orientiert sich an dem synthetischen oder natürlichen Ursprung, bzw. an organischer oder anorganischer Zusammensetzung der Materialien und trennt folgende vier Gruppen, die in Tabelle 1 dargestellt sind:

Tab. 1:

Die „...vier Biomaterial -Typen...“ von Hutmacher et al.: Synthetisch/ Organisch, Synthetisch Anorganisch, Natürlich Organisch und Natürlich/ Anorganisch (Hutmacher DW 2001). Die Material-Beispiele sind grau hinterlegt.

	ORGANISCH	ANORGANISCH
SYNTHETISCH	Aliphatische Polyester, Polyethylenglycol	Hydroxylapatit, Gips, Glaskeramik, Trikalziumphosphat,
NATÜRLICH	Kollagen, Fibrinkleber, Hyaluronsäure	Hydroxylapatit aus Korallen (Bojescul JA 2005)

Biomaterialien können andererseits auch in Gewebe-Induktiv versus Gewebe-Konduktiv unterteilt werden. Gewebekonduktive Werkstoffe unterstützen die Generation der Neomatrix im Rahmen ihrer passiven Gerüstfunktion. Das noch relative junge Design tissue-induktiver Materialien , auch “smart materials” genannt, misst den Leitschienen eine neue Bedeutung bei: durch gezielte Freisetzung bioaktiver Moleküle, bzw. Protein-/ Peptidäquivalenten, die in freigesetzten Substraten enthalten sind, nehmen Leitschienen aktiv an der Regulation adhärenter Zellen teil (Anderson DG 2004). Die Herstellung induktiver Materialien, die nachgeschaltete Reaktionen auf genetischer Ebene und ganz ohne exogene Wachstumsfaktoren, aufwendige Liganden-Integration oder Spezialbeschichtungen beeinflussen können, birgt großes Potential für die Entwicklung erfolgreicher Tissue Engineering–Therapien (Mahmood TA 2006).

Design und Herstellung

In der Literatur sind zahlreiche technische Ansätze zur Synthese retikulärer, poröser Strukturen für den Tissue Engineering-Gebrauch beschrieben; aus diesem Verfahrensspektrum werden bisher jedoch nur wenige gezielt eingesetzt, um definierte dreidimensionale Gerüststrukturen für das Tissue Engineering zu fertigen. Viele dieser Methoden wurden zudem zur Herstellung von Prototypen für die Untersuchung sehr spezifischer Fragestellungen herangezogen, die Eignung der Fertigungsmethoden für eine konventionelle „Massenanproduktion“ wurde meist vernachlässigt (Giselbrecht S 2005) Im Hinblick auf die jeweils angestrebte Tissue Engineering-Applikation weisen die Methoden sowohl Vor-, als auch Nachteile auf.

Tab. 2:

Auflistung verschiedener gebräuchlicher Scaffold-Designs, Materialien und Herstellungsverfahren (Giselbrecht S 2005)

DESIGN	MATERIAL BEISPIELE	VERFAHREN	LITERATUR- Bsp.
Poröse Filterstrukturen/ Membrane, Schäume	Polymere, Keramiken	Sintern, Ionenspurtechnologie, Recken, Phaseninversion, „solvent casting and particulate leaching“ (SCPL), „melt molding“, 3D Printverfahren, Gefriertrocknung	(Goldstein AS 2001; Suh SW 2002; Lee M 2005; Gercek I 2008)
Galertartige Matrizen	Fibrin, Kollagen, synthetische Hydrogele	Polymerisation, Guss	(Wang YJ 2004; Zhao H 2008)
Poröse Mikrosphären bzw. Mikrokapseln	Alginate, Agarose, bioabbaubare Polymere	Vertropfung	(Borden M 2002; Drury JL 2004)
Scaffolds im Chipformat	Polymere, Silizium	Lithographie, Mikrozerspanung, Kunststoffabformung, etc.	(Giselbrecht S 2002; Gottwald E 2007)
Mikroporöse Hohlfasern	Polymere	Extrusion kombiniert mit Phaseninversion	(Gloeckner H 2001; Wen X 2006)
Vliese/ textile Gewebe	Polymere	Spinn-, Webtechniken, Flechten, Vernadeln	(Perka C 2000; Ignatova M 2006)
Freiformstrukturen	Polymere, Keramiken, Metalle	Oberbegriff „Rapid Prototyping“ mit diversen „computer aided design“ (CAD)-Techniken: Stereolithographie, Lasersintern, Laminated Object Modelling (LOM), Organprinting, Fuse Deposition Modelling (FDM), 3D Plotting/ Druck, etc.	(Leong KF 2003; Chang R 2008; Peltola SM 2008)

Nachfolgende Tabelle 2 soll einen groben Überblick über die bis heute typischen Scaffold-Designs, verwendete Materialien und entsprechende Herstellungsverfahren geben: Insgesamt gesehen zeigt sich auf dem Gebiet des Scaffold- Designs ein Trend hin zur Kombination verschiedener Fertigungs-Technologien und Biomaterialien, um den mechanischen, physikalischen, chemischen und biologischen Anforderungen der Zellen auf nano-, mikro- und makroskopischer Ebene gerecht zu werden (Moroni L 2008).

1.2 Neovaskularisation

Als limitierenden Faktor gilt im Tissue Engineering komplex dimensionierter Konstrukte das Fehlen eines intrinsischen Gefäßsystems (Details siehe 2.1.2.)

Um dieses Defizit an Wegsystem für den Nähr- und Sauerstofftransport möglichst rasch zu überwinden, ist das Verständnis über die Kaskade gefäßbildender Mechanismen und deren räumliche, bzw. zeitliche Kinetik hilfreich: Blutgefäße können durch zwei unterschiedliche Prozesse entstehen: Angiogenese und Vaskulogenese.

2.2.1 Vaskulogenese

Vaskulogenese findet hauptsächlich im Embryo statt, ist aber auch im erwachsenen Organismus nachgewiesen (Ribatti D 2002). Es handelt sich hierbei um die „de novo“ Formation von Blutgefäßen: aus mesodermalen Stammzellen, d.h. Hämangioblasten und schließlich Endothelialen Progenitorzellen (EPCs) (Angioblasten) werden Kapillaren gebildet, die sich zu einem ersten Gefäßplexus zusammenschließen (Carmeliet P 2005). Durch angiogenetische Prozesse wandelt sich dieses Provisorium darauf in ein funktionales Gefäßsystem um (Patel ZS 2004). Welche Mechanismen bei der Mobilisation der EPCs an den Ort der Neovaskularisation eine Rolle spielen, ist noch nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass mehrere Faktoren, wie stromal-derived factor-1, granulocyte-colonystimulating factor, granulocyte-macrophage colonystimulating factor, Erythropoietin, Angiopoietin und Östrogen daran beteiligt sind (Lokmic Z 2008).

2.2.2. Angiogenese

Im erwachsenen Organismus dominieren angiogenetische Prozesse zur Ausbildung einer Neomikrozirkulation, die Vaskulogenese spielt eine untergeordnete Rolle. Unter dem Begriff Angiogenese versteht man die Formation neuer Blutgefäße aus bereits existierenden. Dieser Prozess ist obligatorisch für die Entwicklung aller Organe, wichtig in der Wundheilung und spielt eine Schlüsselrolle in der Integration, bzw. Funktionalität jeden Implantates; neben regenerativen Prozessen ist Angiogenese sowohl in zu geringem, als auch in überschießendem Maß an einer Vielzahl pathologischer Prozesse (Ischämie, Tumor- und Metastasenwachstum) beteiligt (Patel ZS 2004). In Abhängigkeit von Lage und Stimulation (Adams RH 2007) reagiert das Endothel eines bereits existierenden Gefäßes auf unterschiedlichen Wegen mit Proliferation und Migration: Elongation, Intus-suszeption und „Sprouting“ (Nguyen LL 2001), wobei letzteres den häufigsten Mechanismus darstellt: Endothelzellen eines präexistenten Blutgefäßes werden von der eigenen Endothelschicht derart aktiviert, dass sie mit gesteigerter Proteinase-Funktion die Basalmembran abbauen.

Der Abbau der Basalmembran wiederum involviert verschiedene Systeme, wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteinasen, die die extrazelluläre Matrix auflösen und stattdessen ein Provisorium bilden (Page-McCaw A 2007). Exponierte avb3-Integrine ermöglichen die gerichtete Migration der Endothelzellen unter der Leitung einer sogenannten „Tip-cell“ (Gerhardt H 2003) ins benachbarte Stroma und dortige Proliferation. Dies geschieht unter dem Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Ferrara N 2005), Placental-Derived Growth Factor (Carmeliet P 2001) und Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (Schweigerer L 1987) und führt dazu, dass die proliferierenden ECs Ausläufer bilden, die provisorische Matrix durchbrechen und neue Gefäßlumina bilden (Egginton S 2003). Handelt es sich um größere Gefäße, werden noch periendotheliale Stabilisatoren, wie Perizyten oder glatte Muskelzellen (Gerhardt H 2003) rekrutiert, was zu großen Teilen von plateletderived growth factor-beta (PDGF-b) und Angiopoietinen, sowie deren Rezeptoren PDGFR-b, bzw. Tie-1 und Tie-2 koordiniert wird (Jain RK 2003).

Sobald die Neovaskularisation ein gewisses Stadium erreicht hat, werden Stimulatoren in ihrer Aktivität gebremst, bzw. Hemmstoffe aktiviert (Patel ZS 2004).

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren bekannt. Die Kenntnis über diese Mechanismen verwendet man heute auf dem Gebiet des Tissue Engineering im gezielten Einsatz der Wachstumsfaktoren.

2.3 Lappen- Präfabrikation

Bei der Lappenpräfabrikation handelt es sich um eine in-vivo Technik. Man versteht darunter, dass die Versorgung eines definierten Gewebeareals an einen autologen, mikrochirurgisch generierten Gefäßstiel zur Neovaskularisation übergeben wird (Pribaz JJ 1994). Die Gefäßstiel-Konfiguration variiert in der Literatur zwischen arteriovenösem Loop, Durchflussgefäß oder ligiertem Bündel (Tanaka Y 2003). Zudem werden je nach Arbeitsgruppe Bündel, bzw. Loop für den spontan einsetzenden, angiogenetischen Prozess unter, oder aber in das Zielgewebe platziert. Die sukzessiv generierte, vaskuläre Infrastruktur im Gewebelappen ermöglicht schließlich bei Bedarf das Handling im Sinne eines gestielten oder freien Lappens, beispielsweise in ein Defektgebiet.

2.3.1. Historie und status quo der Lappenpräfabrikation

Die Lappenpräfabrikation gilt als Innovation der Mikrochirurgie, die in den 60er Jahren die Rekonstruktive Chirurgie im Zuge des technischen Fortschritts immens bereicherte:

Da trotz beeindruckender Erfolge (Transplantationen, Replantationen und Lappenchirurgie) das konventionelle Spektrum der Mikrochirurgie durch die anatomische Gefäß-Situation limitiert und von gewissen Nachteilen (funktionelle, ästhetische Einbußen, Hebedefekt-Morbidität) geprägt ist, wurde vor ca. 30 Jahren begonnen, Lappen zu präfabrizieren (Erol OO 1976), d.h. die Versorgung eines definierten Gewebeareals an einen autologen, mikrochirurgisch generierten Gefäßstiel zu übergeben, um diesen schließlich transplantieren zu können (Pribaz JJ 1994). Der Terminus "prefabricated" taucht in der Literatur bereits 1973 in einer Beschreibung von Ösophagus-Rekonstruktionstechniken auf (Bakamjian VY 1973), allerdings unabhängig von der heutigen Definition.

In zuvor definiertem Sinn findet man den Begriff Präfabrikation in der englischen Literatur jedoch erst in den Jahren 1981 und 1982 in Arbeiten von Shen; er beschreibt hier den mikrovaskulären Hauttransfer nach der Implantation eines Gefäßstiels. Trotzdem geht das Konzept zurück auf Erol (Erol OO 1976), der bereits 1976 die erfolgreiche Rekonstruktion verschiedener Gesichtspartien acht pädiatrischer Unfallopfer veröffentlichte. Er beschreibt, wie es ihm gelang, weite Areale am Kopf mithilfe großflächiger Spalthaut zu rekonstruieren, die unter anderem durch Transplantation auf die Arteria temporalis superficialis vaskularisiert und in einen gestielten Lappen transformiert werden konnte. In der gleichen Arbeit beschreibt Erol eine tierexperimentelle Serie, die er der klinischen vorangestellt hatte, um die Validität dieses Konzeptes zu prüfen. In den 80er Jahren gewann das Prinzip Präfabrikation mehr und mehr an Bedeutung, verlor aber im gleichen Zuge an Spezifität; und in der Literatur wurde bald unabhängig von einer Gefäßstiel-Implantation bei jeder Art von Lappen-Modifikation von Präfabrikation gesprochen. Dies wird anhand eines Reviews deutlich, indem Khouri et al. unter „principles of flap prefabrication“ Techniken, wie „Delay“, Neovaskularisation von Knochen, Knorpel bis hin zu Bioengineering von Geweben als Präfabrikation beschreiben (Khouri RK 1992). Pribaz und Fine sind es schließlich, die 1994 mit einem Artikel an die wissenschaftliche Öffentlichkeit appellieren und eine klar definierte Verwendung der Begriffe Präfabrikation versus Prälamination einfordern (Pribaz JJ 1994).

Die Autoren schlagen vor, nur dann von Präfabrikation zu sprechen, wenn das Konzept der Operation sich mit der ursprünglichen Idee, beschrieben von Erol, bzw. Shen, deckt (Erol OO 1976; Shen ZY 1981). Im Gegensatz dazu sollte von Prälamination die Rede sein, wenn, wie von Lexner 1924 zum ersten Mal beschrieben, „Fremdgewebe/material“ in ein bereits vaskularisiertes Gebiet implantiert wird, um es schließlich in einen Defekt einbringen zu können. Es versteht sich von selbst, dass beide Techniken auch kombinierbar sind und beide Begriffe „Präfabrikation“, wie „Prälamination“ der spezifischen Beschreibung einer prä-transfer Lappenmodifikation dienen. Sowohl experimentell, als auch klinisch ist mittlerweile die Präfabrikation verschiedener Gewebe, wie z.B. kutanes - (Hirase Y 1987; Hyakusoku H 1987), osteomyokutanes (Hirase Y 1988; Hirase Y 1988), oder „Composite“ – Gewebe (Khouri RK 1991), beschrieben. Trotzdem findet die Lappen-Präfabrikation in der Klinik bisher nur vereinzelt Anwendung (Pribaz JJ 2001; Hoang

NT 2005), gilt jedoch als Hoffnungsträger im Tissue Engineering: Wie bereits in Kap.2.1.2 angedeutet, wird Tissue Engineertes Gewebe ab gewissen Dimensionen mittels Diffusion nicht mehr ausreichend versorgt (Folkman J 1973). Dem in vitro generierten Zell-Konglomerat fehlt primär ein vaskuläres System, so dass der Untergang post implantationem, allen voran zentral in der Leitschiene gelegener Zellen vorprogrammiert ist. Mittels Präfabrikation lassen sich Leitschienen gezielt an Gefäßstiele implantieren (Tan BK 2004) und im Zuge der natürlich einsetzenden Neovaskularisation mit einem intrinsischen Gefäßsystem ausstatten (Hirase Y 1987). Im gleichen Zug gewinnt die Leitschiene den Status eines freien Lappens und lässt sich gleichermaßen bei Bedarf am Stiel frei transferieren. In der Literatur finden sich zahlreiche Modelle, in denen Tissue Engineering routiniert mit der Technik der Lappenpräfabrikation kombiniert wird (Nguyen TH 2005; Tanaka Y 2006; Arkudas A 2007; Lokmic Z 2007; Ren LL 2008).

2.4 Knorpelgewebe

Das Wort Knorpel geht auf das 15. Jahrhundert zurück, in dem der Anlaut „kn-“ in germanischer Sprache Ausdruck für verdickte Gegenstände ist und bezeichnete im eigentlichen Sinn die festeren Anteile der Ohrmuschel (Kluge F. SE 1999).

Gewebe ist heute folgendermaßen definiert: Verband gleichartig differenzierter Zellen mit aus ihnen hervorgegangener Interzellulärsubstanz. Zur Entität Gewebe zählen Epithel-, Muskel-, Nerven- und Binde-, bzw. Stützgewebe (Leonhardt H 1990).

Knorpel gilt wegen des hohen Gehalts an extrazellulärer Matrix und daraus resultierender Druckfestigkeit als Stützgewebe. Diese entsteht aus der dreidimensionalen, retikulären Anordnung von Kollagenfaser-Anteilen. In der Literatur ist Knorpel wegen der verhältnismäßig großflächigen Verteilung im Fötus teilweise als „embryonales Gewebe“ zu finden (Archer CW 2003). Hier stellt er die Leitschienen für die Ausbildung der Skelettelemente dar. Im adulten Organismus ist die permanente Knorpelverteilung schließlich auf verschiedene loci limitiert und dient allen voran der mechanischen Stabilität und Bewegung.

Im Zellkulturexperiment konnte die Verwandtschaft der Knorpelzelle zum Fibroblasten belegt werden (Glowacki J 1983) Charakteristische Besonderheiten des Knorpels sind:

- Chondrozyten liegen zytoplasmatisch isoliert, eingebettet in voluminöser Extrazellulärmatrix (hohes Matrix/Zellvolumen-Verhältnis)
- Knorpelgewebe ist weder vaskularisiert, noch innerviert
- die Versorgung von Knorpelgewebe erfolgt via Diffusion bei geringer Sauerstoffkonzentrationsdichte
- Hauptenergiebedarf des Gewebes wird mittels Glykolyse gedeckt
- Knorpelgewebe besitzt nach erfolgtem Skelettaufbau kaum Potential zur Regeneration.

2.4.1. Zellursprung und Differenzierung

Der Differenzierungsweg von Chondrozyten beginnt embryonal mit Mesenchymal-Zellen des Mesoderm und der Neuralleiste. Diese werden aufgrund ihrer Fähigkeit, Knorpelgrundsubstanz in Form von Proetoglykane zu sezernieren, auch Chondroblasten genannt, bzw. in dichter Formation als Vorknorpel bezeichnet. Chondrozyten der Kopf- und Klavikula-Region bilden eine Ausnahme: sie formieren sich getriggert von mechanischer Stimulation aus einer periostalen Schicht bindegewebiger Vorläufer-Zellen, sogenannten Mechanozyten; sie gelten als Sekundäre Chondrozyten (Hall BK 2000).

Chondroblasten-Kondensation im wachsenden Skelett deutet auf beginnende Differenzierungsprozesse hin. Molekularbiologische Details der Kondensation sind noch unbekannt, allerdings ist die entscheidende Beteiligung der Adhäsionsmoleküle N-CAM und N-Cadherin nachgewiesen (DeLise AM 2000). Während der Kondensation werden spezifische Moleküle exprimiert, darunter der Transkriptionsfaktor Sox9, der für die Kollagen IIa - Synthese ausschlaggebend ist. Das Chondroblasten-Stadium gilt mit der Synthese von Kollagen IIa als abgeschlossen, da Chondroblasten lediglich zur Synthese der Isoform Kollagen II befähigt sind. (Lefebvre V 1997; de Crombrughe B 2000). Weitere Faktoren, die beim Differenzierungsprozess der Chondrogenese in Koexpression von Sox9 nachgewiesen werden konnten, sind neben zahlreichen anderen Faktoren z.B. L-Sox5 und Sox-6 (Lefebvre V 1998; DeLise AM 2000; Hall BK 2000).

Die End-Differenzierung von Chondrozyten variiert schließlich je nach Ursprung und Lokalisation - genaue Mechanismen sind bisher noch nicht untersucht: artikulärer

Knorpel beispielsweise persistiert, Knorpelzellen innerhalb der Epiphysenfugen hingegen hypertrophieren. Letzteres endet mit Apoptose oder Metaplasie der Zelle in einen Osteoblasten und Kalzifizierung der umliegenden Matrix, genannt „Enchondrale Ossifikation“ (Roach HI 1997; Zerega B 1999). Fest steht, dass lediglich nicht-ausgereifte Chondrozyten vermehrungsfähig sind und Knorpel als einziges Gewebe im Knochen die Fähigkeit besitzt, durch Teilung interstitiell, bzw. appositionell zu wachsen. Matrix-Sezernierung, Zell-Proliferation und Hypertrophie sind nicht nur während des Wachstums, sondern auch während der Frakturheilung von Bedeutung.

Ausdifferenziert findet sich Knorpel in drei Formen, die sich hauptsächlich in den Faseranteilen ihrer Matrix voneinander unterscheiden: Hyaliner Knorpel, Elastischer Knorpel und Faserknorpel (Benninghoff A. DD 2003).

2.4.2. Morphologie und Funktion

Charakteristikum der Knorpelzelle ist ihre runde bzw. polygonale Form; nur an Grenzflächen, wie z.B. einer Gelenkoberfläche findet man sie abgeflacht oder diskoid. Knorpelzellen bilden keine Fortsätze aus, ihre Oberfläche erscheint Lichtmikroskopisch glatt; elektronenmikroskopisch werden oberflächenvergrößernde Strukturen sichtbar: Invaginationen und Mikrovilli. Diese begünstigen die metabolischen Vorgänge zwischen Zelle und angrenzender Matrix, dem sogenannten Zellhof. Knorpelzellen liegen in Knorpelhöhlen, die den Raum darstellen, den die Zellen inmitten der Interzellulärsubstanz ausfüllen. Knorpelzellen, bzw. Knorpelzellgruppen werden schalenartig von einem Hof umgeben, der Kollagenfaser-arm, und Glykosaminoglykan-reich ist. Zwischen Zelle und Hof befindet sich ein schmaler, stark lichtbrechender Randsaum, die sogenannte Knorpelkapsel. Der Zusammenschluss mehrerer rundovaler Knorpelzellen mit umliegendem Hof gilt als Knorpelterritorium, bzw. Chondron, einer funktio-morphologische Einheit. Die zellarme Matrix zwischen den Territorien wird Interterritorium genannt (Sobotta J. WU 2003). Um die einzelnen Chondrone verlaufen kollagene und elastische Fasern in einer Anordnung, die der jeweiligen Druck- und/oder Zugeinwirkung entspricht und die Festigkeit des Knorpels insgesamt erhöht. Je nach Belastung bilden Chondrozyten an verschiedenen Stellen des Körpers

unterschiedliche Arten von Knorpel: Hyalinen Knorpel, Elastischen Knorpel, Faserknorpel und die, für die Knochenbildung wichtige Wachstumsfuge (Leonhardt H 1990). Knorpel wird von bindegewebigem Perichondrium umgeben, das sich aus zwei Schichten zusammensetzt (Stratum cellulare und Stratum fibrosum). Der Übergang Knorpel/ Perichondrium ist fließend und eine Gliederung in einzelne Chondrone nicht mehr vorhanden.

Intrazellulär können Knorpelzellen typische Zeichen für metabolische Aktivität aufweisen: Gut entwickeltes raues Endoplasmatisches Retikulum, großer Golgi-Apparat, viele Vesikel (Sobotta J. WU 2003). Aus Vimentin aufgebaute Intermediärfilamente sind reich entwickelt. Evtl. intrazellulär vorhandene Lipidtropfen, bzw. Glykogen-Depots deuten auf die Deckung des Energiebedarfs mittels Glykolyse-Vorgänge hin. Bindeglied zwischen Knorpelzelle und Matrix ist das in der Zellmembran lokalisierte Protein Chondronektin (Hewitt AT 1980).

Knorpelmatrix wird von den Zellen produziert und setzt sich aus Kollagen II, IX, X, XI, Hyaluronsäure und dem mit ihr verbundenen Proteoglycan Aggrecan zusammen. Im Aggrecan vorhandene Keratan- und Chondroitinsulfat-Ketten verhalten sich stark hydrophil. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Proteoglykanen und Wassermolekülen resultieren in der wässrigen Phase des Materials und der hoch viskoelastischen, gallertartigen Material-Konsistenz. Die gleichzeitige Formstabilität wird von bis zu 3-4 mm großen Molekülkomplexen aus Hyaluronsäure und Aggrecan garantiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass Proteoglykane unter Kompression die Mobilität der wässrigen Komponente drosseln während Kollagene unter Zugbelastung zum Hauptlastträger werden. In Anbetracht der „Schichtbauweise“ von Knorpelgewebe ergeben sich jedoch verschiedene Elastizitätsmoduln in verschiedene Richtungen (Jancar J 2007). Ausdifferenziertes Knorpelgewebe ist weder vaskularisiert noch innerviert, da Chondrozyten einen Angiogenese-Inhibitor produzieren (ChDI chondrocyte derived inhibitor) (Moses MA 1990). Der metabolische Austausch funktioniert allein durch Diffusion und zwangsläufig bei geringer Sauerstoffkonzentration von ca. 10% an Oberflächen, bis zu <1% in der Tiefe.

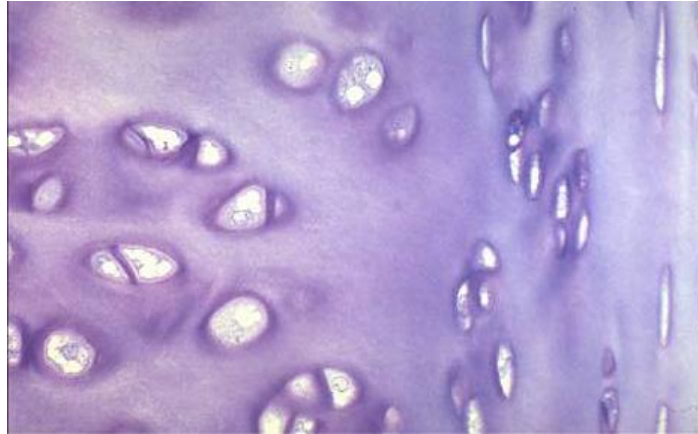


Abb. 5:

Ausschnitt aus hyalinem Knorpel: Peripher vereizelte, rundovale Chondrozyten; zentral rundliche Knorpelzellgruppen eingelagert in maskiert homogene Interzellularsubstanz (Hannover T; Lefebvre V 1997).

Es konnte nachgewiesen werden, dass es vor allem bei geringen Sauerstoffkonzentrationen zur Up-Regulierung diverser anaboler Gene, wie z.B. TGF, oder „Connective tissue growth factor“ kommt (Grimshaw MJ 2001).

Die Funktion von Chondrozyten ist wie ihre Differenzierung abhängig von der Lokalisation. Wie zuvor bereits erwähnt, spielen Chondrozyten in Assoziation mit Epiphysenfugen während des Wachstums eine entscheidende Rolle. Die Anteile hingegen, die Strukturen mit bestimmten Stabilitätsanforderungen auskleiden (z.B. Trachea, Nase, Gelenkfläche), fungieren hauptsächlich durch Synthese und Erhalt der mechanisch stabilen Extrazellular-Matrix. Dabei kommt es zu einem hohen Matrix-Zell-Volumenverhältnis mit einem zellulären Anteil im Gesamtgewebeverband von minimal 10% (Stockwell R 1979).

Da in dieser Arbeit ausschließlich hyaliner Knorpel verwendet wurde, wird im folgenden auf Details über Elastischen- und Faserknorpel verzichtet und ausschließlich auf hyalinen Knorpel Bezug genommen: Die Bezeichnung „Hyalin“ leitet sich aus dem griechischen [gr. υαλος - Glas] ab und deutet auf die bläulich durchscheinende Konsistenz im lebensfrischen Zustand hin. Aufgrund der stark negativ geladenen Glycosaminoglykan-Gruppen der Proteoglykane (Chondroitinsulfat und Keratansulfat) besteht Hyaliner Knorpel zu 60-70% aus Wasser. Der Anteil an Proteoglykanen und Typ II- Kollagen der Extracellulärmatrix (ECM) beläuft sich auf 42% (in Trockenform).

Weiter finden sich geringe Mengen anderer Kollagen-Typen, wie z.B. Typ IX und Typ X, deren Anteil steigt, wenn Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation hypertrophieren (Bloom W FD 1975). Hinzu kommen ca. 7 % wasserunlösliches Protein und 10% Mineralien. Hyaliner Knorpel ist das am häufigsten vorkommende Knorpelgewebe im fetalen und adulten Organismus. Er findet sich in der embryonale Skelettanlage, an gelenkbildenden Oberflächen (Cartilago articularis), Schulterblättern (Cartilago scapulae), Rippen (Cartilago costalis), in den luftleitenden Atemwegen (Nase, Trachea, Bronchien) und im Kehlkopf (Cartilago thyroidea, Cartilago cricoidea, Großteile des Cartilago arytenoidea). Hyaliner Knorpel ist vorwiegend auf Druckbeanspruchung ausgelegt. In der Knorpelperipherie dominieren einzeln liegende, längs-ovale, im Zentrum Gruppen rundlicher Zellen. Die Interzellulärsubstanz scheint homogen, die einzelnen Fasern sind lichtmikroskopisch maskiert (Abb. 5). Im Alter können sich Kalksalze einlagern, die den hyalinen Knorpel spröde und brüchig werden lassen.

2.4.3. Knorpelassoziierte Pathologie

Heute sind diverse Erkrankungen bekannt, die auf genetischer Ebene mit einer abnormalen Differenzierung von Knochen- und Knorpelgewebe einhergehen. Mutationen auf den Rezeptorgenen FGFR2 und FGFR 3 auf Chromosom 4 (fibroblast growth factor receptor 2 bzw. 3) sind beispielsweise mit Hypochondroplasie, bzw. der Achondroplasie assoziiert. Hier kommt es zu abnormen Körperproportionen, da FGFR Rezeptoren auch in Abwesenheit des Wachstumsfaktors die Zelldifferenzierung stimulieren, bzw. Zellteilung inhibieren, was zur verfrühten enchondralen Ossifikation führt (van Ravenswaaij-Arts CM 2001). Eine ebenfalls osteochondrodysplastisch bedingte Klinik findet sich bei der Kamptomelen Dysplasie mit Mutation auf dem Sox9 Gen (Lefebvre V 1997). Die genauere Wirkung des Sox9 Genprodukts wurde bereits in Kap 2.4.1. erörtert. Auch extrazelluläre Matrix-Komponenten können von genetischen Mutationen betroffen sein und resultieren in mangelnder Matrixintegrität; dies erhöht z.B. die Prädisposition eines Gelenkes gegenüber osteoarthritischen Prozessen, bzw. geht im Fall des homozygoten Trägers einer COL9A 1 Mutation mit einer Chondrodysplasie einher (Nakata K 1993).

Schließlich ist die Agenesie, bzw. Mikrosomie ganzer Knorpelstrukturen, der Ohrmuschel (Anotie, Mikrotie) mit allein in 0,76 – 2,35 Fällen pro 10.000 Geburten in der westlichen Bevölkerung als relativ häufige kongenitale Anomalie einzustufen, die nicht zwingend mit Syndromen (Goldenhaar-, Francheschetti-Syndrom) vergesellschaftet sein muss. Trotzdem sind Störungen der Morphologie, Funktion oder Struktur von Knorpelgewebe auf molekularbiologischer bzw. embryonaler Ebene im Vergleich zu degenerativen Knorpelveränderungen verhältnismäßig selten. Die Degeneration ergibt sich aus dem mangelnden Potential zur Regeneration, bei sinkendem Wassergehalt des Knorpels sowie Abnahme des Chondroitinsulfat-Anteils der Proteoglykane im Alter; mit der Verschlechterung der Stoffwechsellage kommt es schließlich stellenweise zum Untergang der Zellen.

Zu den degenerativen Erkrankungen zählt vor allem die Arthrose mit Knorpel-Demaskierung durch Zerfall der Interzellular-Matrix. Beteiligt am erosiven Prozess sind vorrangig die Enzymklassen MMPs (Matrix Metalloproteinasen) und ADAM-TS4, bzw. ADAM-TS5, die Kollagen- und Proteoglykan-Anteile der Matrix zerklüften. Trotz guter Adaptationsfähigkeit gegenüber chronischer Belastung gilt allen voran Überlastung, aber auch Trophischen Störungen, Immobilisation, Trauma, Gelenks-Fehlstellung, knöcherne Deformierung (z.B. Osteoporose) oder andere Primärerkrankungen, wie Arthritis als Ursache.

Knorpelgewebe kann auf entzündliche Prozesse umliegender Strukturen mit Aufweichung (Malazie) reagieren, aber auch direkt von einer Entzündung befallen sein (z.B. Außenohr). Sekundär zu Entzündungsprozessen können sich bizarre Verkalkungen im Knorpelgewebe, Chondrokalzinose, entwickeln, die auch rein degenerativ entstehen. Es wird deutlich, dass jeglicher Knorpel-Substanzverlust nicht durch Neubildung von Knorpelmasse ersetzt, höchstens durch minderwertiges Narben-, bisweilen Knochen-Gewebe ausgeglichen wird. Daneben existieren Pathologien, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu unreifem Knorpelgewebe „Chondrom oder Chondroblastom“ genannt werden. Auch wenn ein benignes Chondrom als primärer Knochentumor eingestuft wird, kann es von Knorpel- (Enchondrom), Knochen- (Ekchondrom), oder aber knorpelfreiem (heterotop) Gewebe ausgehen. Histologisch schwer vom Enchondrom abgrenzbar ist das maligne Chondrosarkom. Keine Seltenheit sind zudem traumatische Amputationen, zum Beispiel von Nase,

Ohr oder Augenlid-Skelett, die in der Kopf-, Halschirurgie als große Herausforderung gelten (Koch RJ 2002).

2.4.4. Tissue Engineering von Knorpelzellen - Zellquelle, Scaffolds und Zellkultur

Tissue Engineering von Knorpelgewebe zeichnet sich im Speziellen durch die spezifische Wahl der Zellen sowie Scaffolds aus. Als „Zell-Quelle“ für chondrogenetisches Gewebe wurden bisher näher untersucht: Perichondrium, Periost, Embryonale-, sowie Adulte Stammzellen und frisch isolierte Chondrozyten. Im Hinblick auf die klinische Anwendung scheint die autologe Herkunft des Zellmaterials nach wie vor sinnvoll, da immunologische Komplikationen oder Übertragung infektiösen Materials umgangen werden.

Stammzellen

Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Proliferation, Replikation und Plastizität, bzw. der Differenzierung in verschiedene Zell-Linien. Embryonale Stammzellen gelten als pluripotent, d.h. sie besitzen die größte Differenzierungs-Kapazität in verschiedenen Zelltypen. Das Konzept der spezifischen Zell-Gewinnung aus Embryonalen Stammzellen durch einen gesteuerten Differenzierungsprozess birgt großes Potential im Hinblick auf die Gewebekonstruktion. Trotzdem gilt es allerdings gerade deswegen auch nach wie vor als eines der am meisten kontrovers diskutierten Themen in Wissenschaft und Ethik. Obwohl bereits 1998 die erste embryonale Stammzell-Linie aus menschlichem Fetalgewebe isoliert werden konnte (Thomson JA 1998) sind Fortschritte im Rahmen des Knorpel - Tissue Engineering bis dato limitiert – ein System zur Differenzierung embryonaler Stammzellen in Chondrozyten ist beschrieben (Khillan JS 2006; Singh Khillan J 2007). Und vor kurzem konnte in-vivo gezeigt werden, dass humane embryonale Stammzellen in athymen Mäusen in Chondrozyten differenzieren, allerdings nur unter induktivem Einfluss morphogenetischer Faktoren aus bereits differenzierten Chondrozyten (Hwang NS 2008).

Anders auf dem Gebiet der Adulten Stammzellforschung: Mesenchymale Stammzellen, z.B. aus Knochenmark und Nabelschnur ("Wharton's Jelly") oder Nabelschnur-Blut. Trotz ihres im Vergleich zu embryonalen Stammzellen

eingeschränkten Vermögens zur Selbsterneuerung und einem reduzierten Differenzierungspotential werden sie aufgrund ihrer Multipotenz vielversprechend betrachtet (Csaki C 2008). Entscheidende Vorteile ihrer Verwendung liegen in der klinisch bereits routiniert eingesetzten Gewinnung von Knochenmark, in der geringen Menge an benötigtem Biopsiematerial und in der trotz fortgeschrittenem Spenderalter noch hohen biologischen Aktivität (Shieh SJ 2004). Arbeiten über die *in vitro* Expansion mesenchymaler Stammzellen in Kombination mit Zellträgern (Fuchs JR 2005) und der erfolgreiche Einsatz stammzellbesetzter Scaffolds zur Reparatur knorpeliger Gelenkdefekte sind beschrieben (Liu Y 2006).

Perichondrium

Perichondrale Vorläufer-Zellen können aus perichondralem Gewebe isoliert, kultiviert und mit Hilfe spezifischer Faktoren transdifferenziert werden. Die Effizienz dieser Chondrozyten-Quelle ist jedoch umstritten, und in der Literatur variieren die Angaben über die Quantität des Ertrags. Während nach Implantation von Scaffolds mit Perichondrium-Hülle die Bildung von Neo-Knorpel nicht zwingend stattfindet (Matsuda K 1995), wird die Besiedelung von Kollagenschwämmen mit Perichondrozyten im Bezug auf die gewonnene Knorpelmenge als signifikant lukrativer beschrieben gegenüber der Besiedelung der Schwämme mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (Togo T 2006).

Periost

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erkannte man im Rahmen von Studien zur Frakturheilung die Wichtigkeit des Periosts während der Neo-Chondrogenese (Ham AW 1938). Es stellte sich heraus, dass transplantierte Periost-Grafts wahrscheinlich in Abhängigkeit der Gefäßsituation im Empfängerbett eine Knochen-Knorpel-Gewebmischung ausbilden (Cohen J 1955; Carranza-Bencano A 2000). *In-vivo* Untersuchungen an gezielt verletztem Periost zeigen die reaktive Formation hyalinen Knorpels nach 10 Tagen. Nach 20 Tagen können ossäre Elemente detektiert werden, die nach 40 Tagen dominieren (Emans PJ 2005). Dass auch aus dem Periost älterer Spender stammende Zellen noch chondrogenetisches Potential in der Kultur aufweisen, macht diese Quelle zusätzlich interessant (Jansen EJ 2008).

Isolierte Chondrozyten

Pionierarbeit auf diesem Sektor wurde 1994 von Vacanti und Vacanti geleistet, die zeigten, dass auf synthetischen Leitschienen gezüchtete Chondrozyten bovinen Ursprungs in athymen Mäusen Neoknorpel produzieren können (Vacanti CA 1994). Weitere Untersuchungen brachten hervor, dass auch humane Chondrozyten aus hyalinem Knorpel sich zur Replikation eignen und in Kultur Matrix generieren (Rodriguez A 1999). Von Vorteil ist hier die hypoxische und avaskuläre Physiologie des Knorpels, die eine erfolgreiche Isolation der Chondrozyten postoperativ, post mortem und sogar nach gekühlter Lagerung über einen Zeitraum von mehreren Tagen ermöglicht (Schachar NS 1994).

Die Kultur isolierter Chondrozyten selbst ist mit folgenden Schwierigkeiten verbunden: Eine meist geringe Anzahl der in einer Knorpelbiopsie enthaltenen Zellen neigt während der Expansion in der Monolayer-Kultur zur Dedifferenzierung, sobald einzelne Zellen adhärent sind und mit der Teilung begonnen haben. Sie verändern den Phenotyp, verlieren die runde Form und differenzieren in Fibroblasten. Diese, nur teilweise reversible Expression der Markergene zeigt statt Chondrozyten-spezifischem COL2A1 und dem Transkriptionsfaktor Sox9 Fibroblasten-spezifische Gene, z.B. COL1A1, welches die Alpha 1 Kette für Kollagen Typ 1 kodiert (Hardingham T 2002). Eine Monolayer-Kultur der Zellen auf Alginate-Gel (Zaucke F 2001) oder polyHEMA Substrat (Stokes DG 2001) kann jedoch zur Reexpression der oben genannten Chondrozyten-spezifischen COL2A1 und Sox9 Gene führen. Daneben wurden spezielle bioartifizielle 3D-Kultursysteme entwickelt, wie zum Beispiel das in vitro Macroaggregat Kultursystem (Naumann A 2004). Standardisiert ist mittlerweile auch die Verwendung von Wachstumsfaktoren, nachdem gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe von z.B. Fibronectin (Martin JA 1998), IGF-I, TGF- β (van Osch GJ 1998) oder PDGF (Weiser L 1999) Einfluss auf die Matrixbildung in der 3D Kultur genommen werden kann. Die Implantation autologer Chondrozyten, die z.B. in peripheren Gelenkarealen entnommen und in vitro expandiert wurden, gewinnt in der Orthopädie mehr und mehr an klinischer Bedeutung (Fu FH 2005). Langzeitergebnisse stehen noch aus und werden Aufschluss für die Anwendung im Zusammenhang mit Scaffolds geben.

Obwohl auf dem Gebiet der Zellbiologie enorme Fortschritte gemacht wurden, haben sich die Methoden der in-vitro Kultur humaner Zellen kaum verändert und in vielen Laboratorien wird mit der konventionellen Monolayer-Kultur gearbeitet. Trotzdem ist diese Kulturkonfiguration in ihrer Möglichkeit, hochdifferenzierte Strukturen zu generieren, limitiert: Zellen neigen während der Expansion rasch zur Dedifferenzierung, was auf die fluktuierende metabolische Situation im Kulturmedium, die unphysiologische Behälteroberfläche und ein erhebliches Kontaminationsrisiko zurückzuführen ist. Cournil-Henrionnet et al. konnten mit Hilfe Flowzytometrie-Analyse zeigen, dass sich mit jeder weiteren Passage einer Chondrozyten-Monolayer Kultur folgender Trend ergibt: Anstieg von Kollagen I, sowie Abnahme von Kollagen II und Sox9. Chondrozyten, die maximal aus Passage 1 geerntet werden, besitzen nach den Resultaten dieser Arbeitsgruppe jedoch genügend Potential zur Redifferenzierung im 3D Skaffold und können erfolgreich im Tissue Engineering eingesetzt werden (Cournil-Henrionnet C 2008). Alternativ werden Bioreaktoren, bzw. Perfusions-Kultursysteme eingesetzt. Sie werden einem hohen Metabolit-Verbrauch in Zellkulturen mit großer Dichte gerecht und minimieren gleichzeitig eine Akkumulation saurer Degradationsprodukte aus Polymer-Skaffolds (Sittinger M 1997).

Über die charakteristische Zellart hinaus ist erfolgreiches Knorpel-Tissue Engineering wesentlich von der Verwendung spezieller Leitschienen abhängig. Diese müssen nicht nur bereits oben genannte gängige Skaffold-Eigenschaften wie Biokompatibilität, Biodegradibilität, Formstabilität, etc. aufweisen, sondern auch die äußerst komplexe Biomechanik des zu regenerierenden Knorpelgewebes imitieren. Diese biomechanischen Charakteristika stehen in engem Zusammenhang mit der Komposition und Organisation mikrostruktureller Bestandteile des Knorpels. Das Kompressionsmodul K ist beispielsweise auf die Proteoglykan-Wasser Verbindungen zurückzuführen, während das Elastizitätsmodul E eher in Abhängigkeit des Kollagennetzwerkes gesehen wird. Hinzu kommt, dass es sich bei experimentell ermittelten physikalischen Werten zur Charakterisierung der Biomechanik nur um effektive Werte handeln kann, da sich Knorpelgewebe aus verschiedenen elastischen Moduln zusammensetzt, die in verschiedene Richtungen ausgelegt sind (Jancar J 2007).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass humaner Septumknorpel anisotrop aufgebaut ist und die Formfestigkeit dadurch unter Kompression in vertikaler Richtung höher ist als in medialer (Richmon JD 2006). Zu bedenken gilt außerdem, dass biomechanische Eigenschaften altersabhängig sind und systemische Prozesse der Knorpel-Degeneration unabhängig von mechanischer Belastung stattfinden (Rotter N 2002). Trotz dieser komplexen Zusammenhänge wurden bereits zahlreiche Leitschienen speziell für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe entwickelt und getestet. Nicht immer werden die Materialien den Anforderungen gerecht und lenken das Knorpelwachstum in die gewünschte Dreidimensionalität oder leisten die gerade initial notwendige, mechanische Stabilität: So wurde beobachtet, wie es Zellen mit der Expression kontraktile Aktin-Komponenten möglich war, ein Scaffold aus Kollagen-Glykosaminoglykan zu deformieren (Spector M 2002). Zahlreiche natürliche wie synthetische Scaffolds wurden bereits für das Engineering von Knorpelgewebe hergestellt und getestet:

Synthetische Polymere

Für die Produktion von Scaffolds unterschiedlichster geometrischer Formen ist im Knorpel Tissue Engineering der Einsatz von Polyhydroxysäuren aus Polylactiden, Polyglycoliden und deren Kopolymeren weit verbreitet. Bereits die ersten Versuche auf diesem Gebiet wurden mit synthetischen Polymeren (Polyesterester) durchgeführt (Langer R 1993). Die biodegradierbaren Polyester Poly L-lactic acid (PLLA), Polyglycolacid (PGA), und deren Copolymer Poly DL-lactic-coglycolic acid, etc. erfüllen zahlreiche Anforderungen für eine zelluläre Besiedelung und den Einsatz als Knorpelgewebs-Leitschiene. Zudem lässt sich der hydrolytische Abbau der Materialien in nicht-toxische Metabolite zeitlich gezielt beeinflussen. Polymerfaser-Konstrukte wurden intensiv untersucht (Vacanti CA 1991; Kim WS 1994; Cao Y 1997): Dabei konnte im Phasenkontrastmikroskop eine mehrlagige Knorpelzell-Adhärenz an sich verzweigenden PGA-Fasern ohne Verlust der runden Zellform beobachtet werden; dies zeigt, dass Chondrozyten in dieser Konfiguration ihre Fähigkeit zur Produktion differenzierter Matrixproteine nicht einbüßen. PLLA beschichtete Polymere sind im Gegensatz dazu hydrophiler und zeigen eine stärker ausgeprägte Chondrozytenadhärenz. PGA Polymer Scaffolds mit chondrozytärer Besiedelung wurden auch im Tierexperiment eingehend untersucht; in vielen dieser

Studien wurden die Zellkonstrukte subkutan bei Immuninkompetenten Mäusen angebracht. Kim et al. (Kim WS 1994) konnten zeigen, dass PGA den mechanischen Anforderungen in-vivo gerecht wird und einfache geometrische Formen erhalten bleiben. Trotzdem weisen synthetische Polymere als Leitschienen im Knorpel Tissue Engineering Nachteile auf: Die Herstellung von PGA Skaffolds in definiert geometrische Formen gestaltet sich als schwierig, die hydrophobe Oberfläche erschwert eine Zelladhäsion und nach der in-vivo Implantation, beispielsweise von PGA, wurden Fremdkörperreaktionen beobachtet (Cao Y 1998). Seit einiger Zeit lässt sich gesteigertes Interesse an der Entwicklung von biodegradablen Elastomer-Scaffolds (elastische Kunststoffe) im Knorpel Tissue Engineering feststellen. Hierbei gelten Polyurethane, die nachweislich nicht in toxische Produkte degradieren, als vielversprechend (Grad S 2003).

Biologische Scaffolds

Als Scaffold natürlichen Ursprungs wurden bisher z.B. der porcine "small intestinal submucosal graft" (SIS) (Pribitkin EA 2004), demineralisierte Knochenmatrix (Naumann A 2003) oder Kollagen eingesetzt. Die Verwendung von Kollagen als Leitschiene im KnorpelTissue Engineering scheint insofern nahe liegend, als dass Kollagen ein wichtiges Strukturmolekül in der Extrazellular Matrix von Knorpel ist. Mittlerweile sind mehrere Verfahren zur Herstellung von Kollagen-Scaffolds bekannt. Das Ausgangsmaterial ist bovinen Ursprungs und die Komposition variiert von singulärer Verarbeitung bis hin zur Verarbeitung mehrere Kollagene.

Schließlich lassen sich biomechanische und biologische Eigenschaften gezielt auf die Knorpelbildung modifizieren (Speer DP 1979). Arbeitsgruppen berichten von einer erfolgreichen Chondrozytenadhärenz und einem persistenten Zell-Phänotyp (Fuss M 2000; Lee CR 2000). Im Vergleich zu oben beschriebenen synthetischen Scaffolds scheint die Kollagen-Leitschiene die Kollagenproduktion anzuregen, wohingegen PGA die Proteoglykan-Synthese fördert (Grande DA 1997). Allerdings bergen auch Kollagen-Leitschienen die Gefahr einer Fremdkörperreaktion (Fujisato T 1996).

Hyaluronsäure

Es konnte gezeigt werden, dass Hyaluronsäure die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen in Chondrozyten unterstützt. Zudem wird angenommen, dass Hyaluronsäure im differenzierten Knorpel Einfluss auf die Chondrozytenfunktion nimmt und während Reparaturprozessen Bedingungen schafft, die denen embryonaler Entwicklungsstadien ähneln (Solchaga LA 2000; Toole BP 2001). Eine Formulierung in verschiedene physikalisch-, chemische Entitäten ist möglich, die auf Bedingungen für das Knorpel-Tissue Engineering abgestimmt werden können (Aigner J 1998).

Hydrogel Scaffolds

Der Wunsch nach einer flexiblen Leitschiene zur minimalinvasiven Implantation stimulierte Wissenschaftler zur Verwendung von Polymeren in Form sogenannter Hydrogele. Dabei handelt es sich um gallertige Kolloide, die sich unter kontrollierten Bedingungen dreidimensional formstabil verhalten. Zur Herstellung werden Polymere in Wasser gelöst und durch Addition vernetzender Agentien geliert. Die Eigenschaften der Hydrogele leiten sich dabei aus dem hohen Wassergehalt und der Elastizität ab. Hydrogele stellen eine dreidimensionale Matrix, die mit der Immobilisation der Chondrozyten in der wässrigen Matrix gute Bedingungen für Erhalt und Funktion der Zellen schafft (Hauselmann HJ 1994). Beispiele für Hydrogele als Zellträger im Knorpel Tissue Engineering wären unter anderem Alginat (Hauselmann HJ 1992; Paige KT 1995) Chitosan (Lahiji A 2000; Sechriest VF 2000) und Fibrin Kleber (Ahmed TA 2008). Die Biokompatibilität von Fibrinkleber erklärt sich durch die Herstellungsmöglichkeit aus autologen Blutbestandteilen (Park MS 1993; Silverman RP 1999). Die Biodegradierbarkeit lässt sich durch Agentien wie z.B. Aprotinin beeinflussen, das antifibrinolytisch wirken. Trotzdem hat sich in in-vivo Experimenten herausgestellt, dass mit Knorpelzellen befüllter Fibrinkleber nach Injektion in das Versuchstier drastisch an Volumen verliert, was durch mangelnde mechanische Stabilität erklärt wird. Da chemische Parameter biologischer Hydrogele variieren und schwer kontrollierbar sind, wurden synthetische Gele, wie z.B. Polyether Polyethylenoxid (PEO), Polyvinylalkohol (PVA) entwickelt (Silverman RP 1999). Die Limitationen in der Verwendung von Hydrogelen sind jedoch nach wie vor mechanische Defizite sowie Schwierigkeiten in der räumlichen Verteilung.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Fragestellung und Zielsetzung

Auf dem Gebiet des Tissue Engineering sind bis heute viele Fragen bezüglich Leitschienen-Biokompatibilität, reaktiver Vorgänge im Empfänger-Areal, langfristiges Verhalten des eingebrachten Gewebes, etc. noch offen, beziehungsweise bedürfen einer Optimierung. Geeignete Modelle für entsprechende Untersuchungen sind hierbei von essentieller Bedeutung, so dass das Ziel dieser Studie darin lag, ein experimentelles Modell in der Maus zu etablieren, mit dem sich basale Fragestellungen rund um die Präfabrikation tissue engineerter Konstrukte klären lassen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen galt es mit denen bisheriger Experimente zu vergleichen, um von einer stellvertretenden Validität dieses Modells ausgehen zu können:

3.2 Studienkonzept und Versuchsgruppen

Zwei unterschiedliche Gefäßkonfigurationen, sowie der zeitliche Verlauf der Neovaskularisation innerhalb eines geschäumten Polyurethan-Scaffolds wurden untersucht.

In einem ersten Versuch wurden noch unbesiedelte Polyurethan-Leitschienen mit einer Isolation gegen umliegendes Gewebe an das femorale Gefäßbündel implantiert; im Sinne der Präfabrikation wurde dieses zuvor aus seiner physiologischen Gefäß-, Nervenscheide gelöst. Für diese Versuchsanordnung wurden insgesamt 56 immunkompetente Mäuse operiert. Die Aufteilung der Tiere erfolgte nach unterschiedlicher in-vivo Implantat-Verweildauer in 4 Hauptgruppen (Woche 1 bis 4) zu je 12 Mäusen, bzw. in 8 Untergruppen (Ligatur versus Durchgängiges Gefäß) zu je 6 Mäusen. Mit 8 zusätzlich gelieferten Reservetieren wurden die vier Hauptgruppen (in-vivo – Verweildauer der Implantate) erweitert: In 1, bzw. 3 Tieren wurden die Implantate am Durchflussgefäß 6 und 9 Wochen belassen. 2 der Reservetiere trugen die Implantate am ligierten Gefäß 9 Wochen (Tab. 3). Nachdem im ersten Versuchsteil die in-vivo Verweildauer ermittelt wurden, nach welcher in der Leitschiene mit maximaler Gefäßneubildung zu rechnen ist, wurde ein zweiter Versuchsteil angeschlossen: hierbei galt es, die Integration dreidimensionaler, Tissue Engineerter Konstrukte, sowie die Persistenz dieser

implantierten Knorpelverbände zu untersuchen. Im Speziellen wurden Knorpelzellkonstrukte humanen -, mit denen bovinen Ursprungs verglichen: für den zweiten Versuchsteil wurden insgesamt 24 immuninkompetente Mäuse operiert. Die Aufteilung der Tiere erfolgte nach unterschiedlicher Implantat in-vivo Verweildauer in zwei Hauptgruppen (eine Woche und sechs Wochen) zu je 12 Tieren, bzw. in 2 Untergruppen unterschiedlich besiedelter Konstrukte (Humane versus Bovine Chondrocyten) zu je 6 Mäusen (Tab. 4).

Zur genauen Auswertung war in beiden Versuchsteilen die Entnahme der Konstrukte nach Euthanasie der Tiere mit anschließender histologischer Aufarbeitung geplant.

In beiden Gruppen erfolgte die Explantation nach determinierter Implantat-Verweildauer von 1, 2, 3, 4, 6 oder 9 Wochen mit jeweils sechs, bzw. sieben Tieren pro Zeitpunkt. Das Material der sieben Tiere aus einer Untergruppe wurde jeweils makroskopisch, als auch mikroskopisch ausgewertet.

Tab. 3:

Verteilung der Versuchstiere nach Implantatverweildauer und Gefäßkonfiguration

Implantat in-vivo - verweildauer (Wochen)	1	2	3	4	9
Gefäßkonfiguration Durchfluss- n = 28 Tiere	6	6	6	6	4
Gefäßkonfiguration Ligatur n = 28 Tiere	6	6	6	6	4

Tab. 4:

Verteilung der Versuchstiere nach Implantatverweildauer, bzw. auf den Ursprung der mit Knorpelzellen besiedelten Implantate.

Implantat in-vivo - verweildauer (Wochen)	1	6
Zellart der besiedelten Konstrukte		
Bovin n = 14	6	6
Human n = 14	6	6

4. Material und Methoden

4.1 Versuchstiere – Pflege und Haltung

Das Versuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TSchG) der Regierung Oberbayern zur Genehmigung vorgelegt und bewilligt (amtliches Aktenkennzeichen: AZ 24-06). Alle Eingriffe wurden unter strikter Berücksichtigung der geltenden Rechtsbestimmungen (TSchG in der Fassung vom 18. Mai 2006) durchgeführt. Die Tiere wurden speziell für Versuchszwecke gezüchtet und von einer zugelassenen Firma (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) bezogen. Als Versuchstiere gingen insgesamt 110 weibliche NMRI Mäuse in einem Alter von ca. 7 Wochen (Lebendgewicht ca. 25 – 30 g) in den Versuch ein; Bei 28 der 110 Tiere handelte es sich um athym (nu/nu) immuninkompetente NMRI Mäuse.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Standardkäfigen aus Makrolon Typ 1500 (Tecniplast, Italien) mit einer Besatzdichte von drei bis fünf Tieren je Käfig. Die Tiere wurden in sogenannten IVC-Käfigsystemen (individually ventilated cages) in klimatisierten Räumen (20 – 25°C Raumtemperatur, relative Luftfeuchte 60-70 %, Hell-Dunkel Rhythmus von 12 Stunden mit Dämmerungsphase) untergebracht. Futter (Alleinfuttermittel „Haltung“ Fa. Sniff) und Wasser wurden ad libitum angeboten. Als Einstreu wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung LIGNOCEL Naturfaser-Compounds (Fa. Rettenmaier & Söhne) verwendet. Vor Besatz wurden diese, ebenso wie Futter und Wasser autoklaviert. Eine Umsetzung der Tiere erfolgte im Wochenrhythmus. Alle Räume waren speziell für die Tierhaltung (gem. § 11 Abs. 1 Nr. 1 TSchG) zugelassen und die artgerechte Pflege wurde von ausgebildetem Tierpflegepersonal gewährleistet.

Für die Nutzung der gesamten Anlage gilt eine personenlimitierte Zutrittskontrolle und hohe Hygienestandards, die das Anlegen spezieller Schutzkleidung bei Betreten der Haltungs- und Operationsräume vorschreiben. Zur Überprüfung des Hygienestatus werden im Betrieb vierteljährlich Sentinel-Tiere mikrobiologisch untersucht, um sicher zu gehen, dass die Tiere nicht an Erkrankungen leiden, die Einfluss auf Versuchsergebnisse nehmen könnten. Zwischen Anlieferung und Versuchsbeginn durchliefen die Mäuse eine Akklimatisationszeit von 10 Tagen.

4.2. Konstrukte

Das Gewebe der Wahl, in diesem Fall hyaliner Knorpel durchläuft auf dem Weg von der Biopsie bis zur „Implantation“ wichtige Produktionsschritte: Das Biopsiematerial wird manuell auf den enzymatischen Verdau vorbereitet, nach welchem es auf die Leitschienen aufgebracht, kultiviert und schließlich implantiert werden kann (Abb. 6).

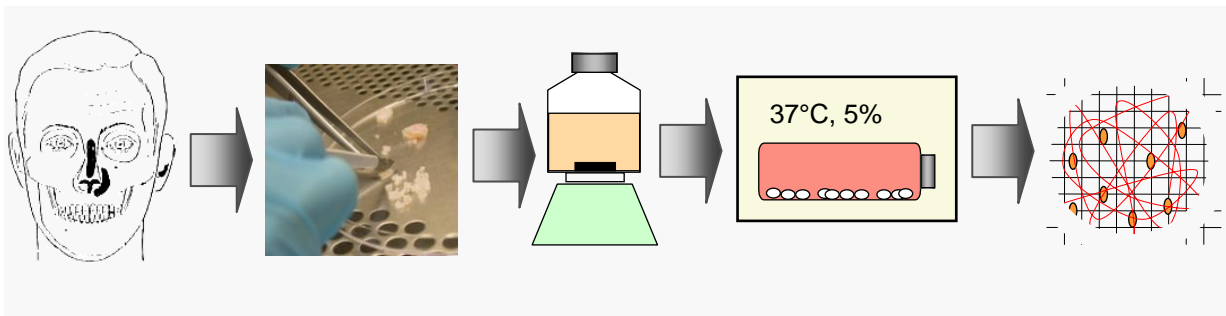


Abb. 6:

Von der Biopsie zum Tissue Engineerten Implantat:: Wichtige Eckpunkte der Herstellung am Beispiel humaner Chondrozyten: Intraoperative Gewebegewinnung von Nasenknorpel, manuelle Vorbereitung auf den enzymatischen Verdau, Leitschienenbefüllung mit isoliertem Zell-Fibringemisch und Inkubation der befüllten Scaffolds in Zellkulturflaschen.

4.2.1. Spendermaterial für Humane und Bovine Chondrozyten

Humane Chondrozyten wurden aus OP-Material (Patientenalter: 20-50, Durchschnittsalter: 41,2) gewonnen, das im Rahmen ärztlicher Eingriffe an der Nase während der Resektion knorpeliger Anteile (z.B. Septorhinoplastik) anfiel. Die Eingriffe wurden in der HNO Klinik des Klinikum München Rechts der Isar durchgeführt und fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Bovine Chondrozyten wurden aus der femoropatellaren Gelenkfläche von ca. 8 Wochen alten Kälbern aus dem lokalen Schlachthof isoliert. Bei Abholung der Proben lag der Todeszeitpunkt der Kälber stets weniger als 12 Stunden zurück, außerdem wurde auf eine Weiterverarbeitung des Materials innerhalb der nächsten fünf Stunden geachtet.

4.2.2. Chondrozyten - Isolation und Expansion

Für den Transport ins aus dem OP ins Zellkultur-Labor wurden das humane OP-Material unmittelbar nach Entnahme in 8 °C kaltem DMEM (Dulbeccos Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit Zusätzen von Penicillin-G-Sodium und Streptomycinsulfat (AA; Antibiotics-Antimykotika, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gelagert: 6ml AA/ 500ml DMEM. Im Labor wurden die Gewebestücke zweimal mit PBS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und von überschüssigem Knochen- und Weichteilgewebe befreit. Gleichermaßen wurden die bovinen Knorpelstücke gehandhabt, die nach Eröffnung der Gelenkkapsel im Labor gewonnen wurden.

Der Knorpel wurde mit einem Skalpell in ca. 1mm³ kleine Gewebe-Stücke zerkleinert und über Nacht in Medium mit Kollagenase verdaut: zur Isolation der Chondrozyten wurde folgende Lösung angesetzt: pro 1g Knorpelgewebe wurden 3ml (1476U) Kollagenase-Typ-II/DMEM-Lösung hergestellt (Gibco, Karlsruhe, Deutschland). Die Inkubationstemperatur während des Verdaus betrug 37°C.

Die gewonnene Zellsuspension konnte nach ca. 8-12 Stunden abpipettiert werden. Durch Zentrifugieren der Suspension bei 2500U/min 10 Minuten konnte ein Pellet gewonnen werden, welches in frischem DMEM mit Zusätzen von AA und FKS (Fetales Kälberserum, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland: 6ml AA/ 500ml DMEM, bzw. 50ml FKS/ 500ml DMEM) resuspendierte wurde.

Ein Pellet von 1g Gewebe wurde auf 15 sterile Zellkulturflaschen verteilt und im Brutschrank unter Monolayer-Bedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Die Zell-Teilungsgeschwindigkeit belief sich auf ca. eine Passage pro Woche, wobei für die Versuche ausschließlich Zellen der Passage 0 verwendet wurden: die expandierten Zellen wurden nach einer Woche manuell mit einem Schaber gelöst, nachdem der Großteil des Mediums aus den Kultur-Flaschen abgegossen worden war.

Zell- Konglomerate wurden mit Hilfe eines 100 µm feinen Zellsiebs herausgefiltert.

Um die Anzahl vitaler Chondrozyten zu bestimmen, wurden 10µl der gefilterten DMEM-Zellsuspension mit 10µl Trypan Blau (Fluka®, Steinheim, Deutschland) versehen, auf die Zählkammern eines Kova Glasstic Slide verteilt (Hycor, Kassel, Deutschland) und unter einem Phasenkontrast Mikroskop ausgezählt.

Die restliche, gefilterte DMEM-Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 2500U/min zentrifugiert; vor der Weiterverwendung musste das entstandene Pellet frei von umgebendem Medium sein.

4.2.3 Die Polyurethan-Leitschiene

3.2.3.1 Herstellung / Eigenschaften

Das Zellträger-Material wurde von der Firma polyMaterials (Kaufbeuren, Deutschland) gefertigt: eine Mischung aus Polycaprolaktondiol ($M_n = 1250$), Polycaprolactontriol ($M_n = 900$) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO 3042, Air products, Hattingen, Deutschland), Dextrose, Methylal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Diazabicycloundezene (Acros, St.Augustin, Deutschland) wurde in eines von zwei Kompartimenten einer Zwei-Komponenten Spritze mit Statischem Mischer gegeben. Das zweite Kompartiment wurde mit Isophorone Diisocyanat und Methylal befüllt und die Spritze auf 37°C angewärmt.

Es folgte die langsame Injektion des Spritzeninhaltes in einen Silikon-Behälter, der zwei Stunden lang bei 67°C aufbewahrt wurde. Um Überschüsse an der Oberfläche der gehärteten Masse zu entfernen wurde das Konstrukt eine Stunde lang in kochendem destillierten Wasser gewaschen 24 Stunden vakuumgetrocknet. Eine detaillierte Charakterisierung des Materials ist dank früherer Messungen möglich: der durchschnittliche Porendurchmesser beträgt 500 µm und der Durchmesser der Öffnungen zwischen den Poren ist im Durchschnitt 200 µm groß. Insgesamt zeichnet sich der Polyurethanschaum durch eine 70- 80 %ige Porosität aus. Weiterhin zeigte die Untersuchung bezüglich mechanischer Stabilität mittels standardisierter Kugeldruckprüfung, dass der Polyurethanschaum eine Härte aufweist, die der von nativem Knorpels gleicht. Die accelerierte in vitro Simulation der Material Degradation zeigte, dass nach ungefähr 1,5 Jahren in-vivo mit einem vollständigen Abbau des Polymers zu rechnen ist.

Für die dargestellten Untersuchungen waren Leitschienen der Größe und Geometrie erforderlich, die von Mäusen auf der Innenseite des Hinterlaufs toleriert werden; somit wurden aus den 2mm dicken, geschäumten PU-Platten mit einer Biopsie-Stanze (Fa. Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach, Deutschland) identische Scheiben mit einem Durchmesser von 5mm herausgelöst. Diese Scaffolds wurden

mit 70% EtOH gespült, sorgfältig mit PBS gewaschen und vor Besiedelung bzw. Implantation im Autoklaven dampfsterilisiert (121 C, 20 Minuten, 2150mbar).

Unmittelbar vor dem Einbringen der Leitschienen in die Versuchstiere wurde unter sterilen Bedingungen die Oberfläche der Scaffolds mit einem Skalpell ca. 1mm tief eingekerbt. Diese Kerbe sollte dem axialen Gefäß-Nervenbündel als Lager dienen (Abb. 7).

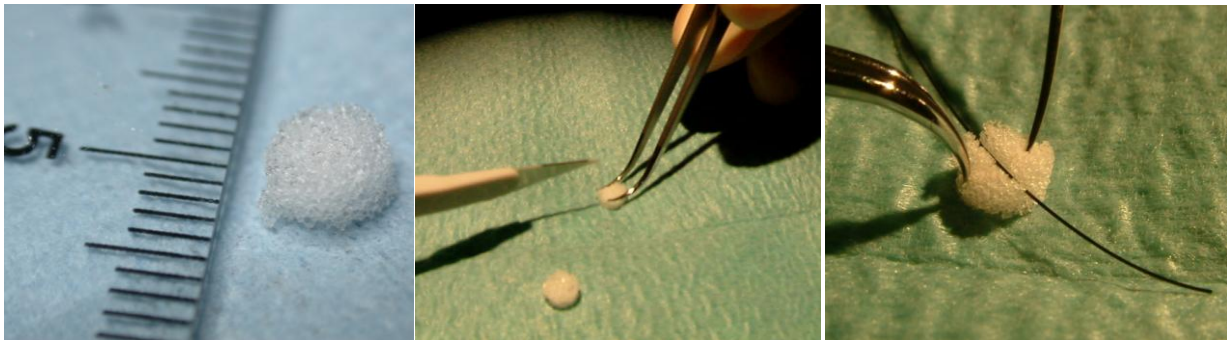


Abb. 7:

Links: unbesiedelte, geschäumte PU-Leitschiene von 2 mm Höhe und 5 mm Durchmesser. Mitte: Vor der Implantation: Mit einem Skalpell wird eine ca. 1 mm tiefe Kerbe in das Scaffold geschnitten, die als Leitschiene für das Gefäßbündel dient. Rechts: Ein Monofiler Faden imitiert hier den Sitz des Gefäßbündels. Ohne die Pinzettenbrachen, die die Kerbe geöffnet halten verschließt sich wie gewünscht, das Scaffold über dem Gefäßbündel.

4.2.4 Zell-Konstrukt-Herstellung bzw. Befüllung und Kultivierung des Biomaterials

Um die Leitschienen gleichmäßig mit Zellen befüllen zu können, wurde ein Zell-Fibrin-Gemisch hergestellt, dessen zähe Konsistenz sich leicht in die interkonnektiven Poren-Räume der Scaffolds spritzen ließ (Eyrich D 2007):

in 20µl Thrombin, Bestandteil von Tissucol (Fa. Baxter, Unterschleißheim, Deutschland; 5U/ ml Thrombinpuffer [Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München]), konnten ca. 8×10^6 Chondrozyten aus dem zentrifugierten Pellet gelöst werden. Dieses Zell-Thrombin-Gemisch, sowie das gleiche Volumen an Fibrinogen-Lösung (100mg Sigma, Hannover, Deutschland pro ml Trasyslol [1000 KIE/ml Bayer, Leverkusen, Deutschland]) wurden jeweils in ein Kompartiment einer Zwei-Komponenten-Spritze gegeben. Die einzelnen PU-Scaffolds wurden, ohne sich gegenseitig zu berühren, auf eine 27G Kanüle (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) aufgespießt und nacheinander mit oben beschriebener Zell-Thrombin-Fibrinogen-

Mischung befüllt, indem jede Leitschiene mehrmals von verschiedenen Seiten punktiert wurde (Abb. 8). Für den anschließenden Gelierungs-Prozess (ca. 30 min bei RT) konnten die befüllten Skaffold-Spieße frei schwebend über einer Petrischale abgelegt werden. Das Fassungsvermögen der Skaffolds belief sich hierbei auf ungefähr 0,13 ml Thrombin- Fibrinogen-Lösung á ca. 5×10^6 Zellen.

Nachdem die Masse den gewünschten Härtegrad erreicht hatte, wurden die Skaffolds gelöst und in Zellkulturflaschen mit Chondrozyten-Medium DMEM (4500 mg/L Glukose (Sigma-Aldrich/ Taufkirchen Deutschland) mit 10% FKS [Fa. Invitrogen, Karlsruhe/ Deutschland], 2,4% AA [Fa. Invitrogen, Karlsruhe/ Deutschland], 1mM nichtessentielle Aminosäuren [Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland], Prolin 4 μ /ml (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 50 μ g/mL Ascorbinsäure [Fa. Fluka, Steinheim, Deutschland] und 2 μ /ml Insulin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gelagert. Die Inkubation erfolgte eine Woche lang bei 37°C, 5% CO₂ in einem Brutschrank; das Medium wurde während dieser Zeit dreimal gewechselt.

Kurz vor Implantation in die immun-inkompetenten NMRI-Mäuse wurden die besiedelten Konstrukte dreimal mit PBS gewaschen.

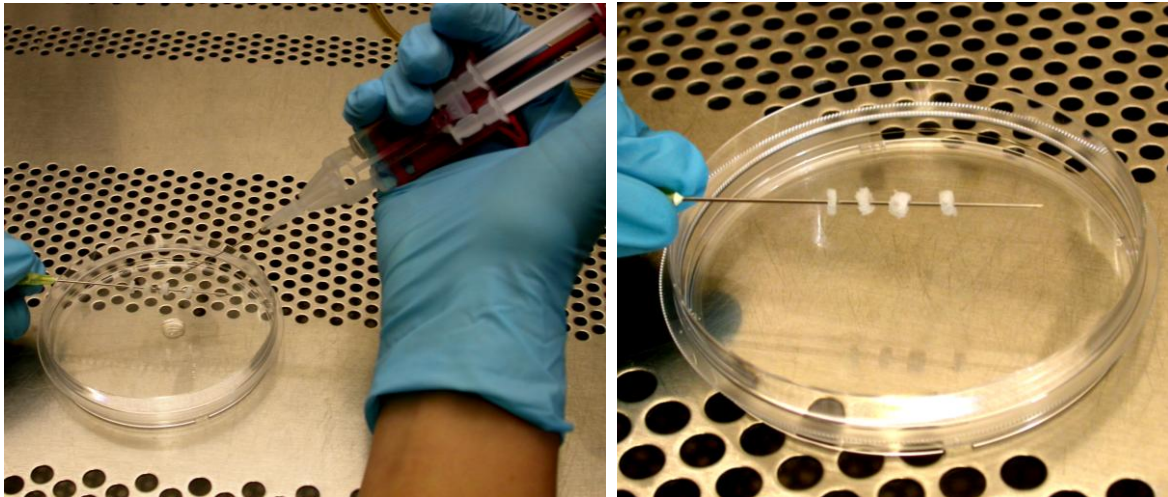


Abb. 8:

Links: manuelles Befüllen der Polyurethanleitschienen mit einem Zell- Fibrin- Gemisch aus einer Zwei- Komponenten Spritze. Rechts: Auf einer Kanüle aufgefädelt Konstrukte nach Befüllung während des Gelierungs-Prozesses.

4.2.5. Zellvitalitätstest

Lebend/Tod-Untersuchung

Die Vitalität der kultivierten Chondrozyten wurde durch kombiniertes Anfärben der besiedelten Konstrukte mit Fluoresceindiacetat (25mg/ml Aceton) (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Propidiumiodid (1mg/ ml H₂O) (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) geprüft. Im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) stellen sich nach einer 30 sekündigen Inkubationszeit vitale Zellen aufgrund folgenden Mechanismus eindrucksvoll grün dar: Fluoresceinacetat passiert via Diffusion die Zellmembran und wird durch unspezifische Esterasen zu einem unpolaren, grün fluoreszierenden Farbstoff hydrolysiert. Avitale Zellen imponieren unter dem Fluoreszenzmikroskop rot, da Propidiumjodid sich über die defekte Zellmembran in die DNA-Helix im Zellinneren integriert.

4.3. Operatives Vorgehen

4.3.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Bei allen Versuchsreihen stand den Tieren bis unmittelbar vor dem Eingriff Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Um die Stressbelastung zu minimieren, erfolgte die präanästhetische Handhabung ruhig und beschränkte sich auf eine adspektorische Untersuchung zur Feststellung der Narkosetauglichkeit sowie die Gewichtsbestimmung. Die Zuteilung zu den unterschiedlichen Versuchsgruppen gestaltete sich nach einem vorab festgelegten Randomisierungsschema. Als Anästhesieverfahren kam eine vollständig antagonisierbare Kombination aus Medetomidin (α -2-Antagonist), Midazolam (Benzodiazepin) und Fentanyl (Opioid) zum Einsatz. Die Kombination wurde unverdünnt in einer Mischspritze intraperitoneal verabreicht. (Tab. 5): Nach Applikation des Narkosegemisches wurden die Tiere bis zum Wirkungseintritt in leere Käfige gesetzt. Die Vorbereitung für die Operation fand nach Verlust der Stellreflexe statt. Sofortiges Aufbringen von Augensalbe (Bepanthen Fa. Roche, Deutschland) konnte eine Schädigung der Kornea verhindern.

Bei den immunkompetenten NMRI-Mäuse folgte die Depilation der OP-Gebiete mit gängiger Haarentfernungscreme (Veet®). Vom Lendenwirbelbereich an nach kaudal

wurden die Tiere gereinigt und mit Hautdesinfektionsmittel vorbereitet (Octenisept®, Kodan, Schülke & Mayr, Deutschland). Die Lagerung zur Operation erfolgte auf einer Heizmatte in Rückenlage mit Fixierung der Hinterbeine in Abduktionsstellung. Eine Sauerstoffmaske (Durchflussrate 1,5 l/ min) gewährte während der Narkose eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere. Die Dauer der chirurgischen Toleranz einer Bolusinjektion war stets zur Durchführung der 30– 60 minütigen Eingriffe ausreichend.

Narkosetiefe, Sauerstoffsättigung und Herz-Kreislauffunktion wurden klinisch „gemonitort“ und mittels Zwischenzehen-Kneifreflex und Beobachtung von Schleimhautfarbe, Bulbusstand, bzw. Palpation der Herzkontraktionen näherungsweise kontrolliert. Die Kennzeichnung und Nummerierung der Tiere erfolgte mit zahlenkodierenden Ohrkerben. Die Narkoseausleitung begann nach Fixierung der Hautnähte durch Sprühkleber (OpSite®, Smith & Nephew, Hull, England) mit einer subkutan verabreichten Teilantagonisierung (Tab. 5):

Tab. 5:

Intraperitoneal applizierte Anästhesie und Antagonisierung: Wirkstoffe und Konzentrationen für Mäuse.

	<i>Wirkstoff</i>	<i>Konzentration</i>
Narkose		
	Medetomidin (<i>Domitor</i> ®, Pfizer)	0,5 mg/kg
	Midazolamhydrochlorid (<i>Dormicum</i> ®, Ratiopharm)	1 ml/kg
	Fentanyl (<i>Fentanyl</i> ®, Janssen-Cilag)	1 ml/kg
Antagonisierung		
	Flumazenil (<i>Anexate</i> ®, Roche)	5ml/kg
	Atipamezolhydrochlorid (<i>Antisedan</i> ®, Pfizer)	0,5 ml/kg

zeitgleich wurde den Tieren zur postoperativen Analgesie ein Bolus Meloxicam (0,06 mg/kg KG, Metacam®, Boehringer Ingelheim, Deutschland) subkutan verabreicht. Sobald erste Anzeichen von Spontanbewegung zu erkennen waren, wurden die Tiere in

einen leeren Käfig zurückgesetzt. Futter und Wasser standen dort ad libitum zur Verfügung. In den ersten postoperativen Stunden wurden die Tiere im Käfig intensiv beobachtet, bevor die ursprünglichen Haltungsgruppen von 3-5 Tieren wieder gebildet wurden. Dauer des Eingriffs bzw. der Narkose, Medikamenten- Dosis und etwaige Besonderheiten wurden für jedes Tier individuell protokolliert.

4.3.2. Operationstechnik und Nachsorge

Die Eingriffe wurden von ein und derselben Person unter Verwendung eines Operationsmikroskops und mikrochirurgischem Besteck standardisiert durchgeführt.

Der operative Zugang erfolgte über einen zweiseitigen Hautlappen in Form eines Dreiecks. Dieser wurde gewählt im Hinblick auf Fortbewegung, damit verbundene Hautspannungslinien sowie einer kompletten Bedeckung des Implantates ohne Kontakt zu den abschließenden Hautnähten.

Die beiden Inzisionslinien wurden mit einem wasserfesten Stift auf der Haut markiert (Abb. 9). Der mediale Schnitt (ca. 1 cm) wurde unter Schonung der Milchleiste parallel zum Leistenband verlaufend von Höhe Spina iliaca anterior superior bis Höhe Os pubis gesetzt. Die laterale Lappeninzision (ca. 1,5 cm) verlief entlang der dorsalen Innenseite des Hinterbeines bis auf Höhe der Poplitealregion angezeichnet. Der proximale Anteil des subkutan verlaufenden Gefäß-, Nervenbündels findet sich somit im Lappenzentrum, das später direkten Kontakt zum isolierten Scaffold hat. Nach Desinfektion der Operationsgebiete wurde der Lappen entlang der Markierungslinien inzidiert.

Während der Implantation blieb der Hautlappen umgeschlagen und wurde mit Ringer-Lactat- Lösung (Ringer-Lösung, Delta-Pharma®, Pfullingen) feucht gehalten. Es folgte die Präparation des femoralen Gefäß-, Nervenbündels unter dem OP-Mikroskop (Zeiss-Universal S2, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) mit 6 facher Vergrößerung; „Inguinales„ Fettgewebe wurde hierfür stumpf beiseite geschoben (Abb. 10). Das Gefäß-, Nerven-Bündel wurde über eine Strecke von ca. 7 mm unter Schonung der Muskulatur untertunnelt. Blutungen, die bei der Durchtrennung kleiner Gefäß-Abgänge entstanden sistierten in der Regel spontan, bzw. wurden vorsichtig

komprimiert. Die Leitschiene konnte platziert werden, indem das Bündel angehoben wurde, ohne dabei Zug auf die Gefäße auszuüben.

Bei der Positionierung des Gefäßes in die vorpräparierte Kerbe des Scaffolds wurde darauf geachtet, den Blutfluss durch evtl. Torsion nicht zu unterbrechen.



Abb. 9:

Narkotisiertes Tier in Rückenlage mit angezeichneter Schnitfführung für einen dreieckigen Hautlappen in der Leistenregion.

Es folgte die Isolation des Konstruktes gegen umliegendes Gewebe mit einem sterilisierten Streifen Silikonfolie (Dicke 0,12mm; bess medizintechnik gmbh®). Die Folie wurde längs unter der Leitschiene hindurchgefädelt und anschließend um das Konstrukt geschlagen. Eine Einzelknopfnah (7-0 Prolene®) wurde auf die überlappenden Streifen-Enden gesetzt, um zu verhindern, dass sich die Folie öffnet, bzw. verrutscht.

In der „Ligatur-Gruppe“ wurden vor Hautverschluss im Anschluss Arterie und Vene durch eine Ligatur (7-0 Prolene®) kurz nach Austritt aus dem distalen Ende der Scaffold-Kerbe verschlossen. Für den anschließenden Wundverschluss wurde der Hautlappen zurückgeschlagen.

Mit nicht resorbierbarem Faden (7/0 Prolene Eticon®) wurden die Wunde mit fortlaufender Naht und intermittierenden Einzelknopfnähten primär verschlossen.

Im Fall der immuninkompetenten Untergruppe des zweiten Versuchsschenkel, die, mit humanen und bovinen Chondrozyten besiedelte Implantate erhielt, wurde den Tieren eine besiedelte Kontrolle ohne direkte Gefäßanbindung subkutan auf die Innenseite des kontralateralen Oberschenkels gelegt. Diese Kontrolle wurde unmittelbar vor der Implantation auf steriler Arbeitsfläche mit einem Silikonstreifen isoliert. Zwei Einzelknopfnähte (Prolene 7-0®) seitlich der Leitschiene verhinderten, dass sich die Folie öffnen bzw. das Scaffold verrutschen könnte.

Nachdem eine Tasche von geeigneter Größe für das isolierte Implantat stumpf präpariert worden war, konnte dieses auf das sichtbare linke femorale Gefäß-, Nervenbündel Bündel gelegt werden. Der Primäre Wundverschluss erfolgte wieder mit fortlaufender Naht (Prolene 7/0, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Bevor das Tier für die Implantation der Kontrolle/n in Bauchlage gedreht wurde, wurde Sprühverband (OpSite, Fa. Smith&Nephew, Hull/ England) auf das Wundgebiet aufgetragen.

Nach Umlagerung der Tiere in Bauchlage und Desinfektion der nuchalen Region wurde interskapulär Hautschnitt von sechs Millimeter Länge gesetzt (Abb. 11). Es folgte die stumpfe Präparation einer Hauttasche nach lateral; die Größe der Hauttasche wurde so gewählt, dass die Kontrolle darin kompressions-frei implantiert werden konnte und das skaffold in ausreichender Entfernung zum Zugang zu liegen kam.

Der Hautschnitt wurde mit zwei bis drei Einzelknopfnähten (7/0 Prolene, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) primär verschlossen.

In der ersten Woche nach dem Eingriff wurden die Tiere speziell auf Anzeichen von Beschwerden und Schmerz nach den Richtlinien von Morton and Griffith (Adspektion von Verhalten, Haltung, Haarkleid, etc.) (Morton DB 1985)

Kontrolliert; es wurde im Speziellen auf Gang- und Kletterverhalten und die Integrität der Hautnähte geachtet. Bei Anzeichen von Unbehagen wären die Tiere sofort analgetisch behandelt worden. Im seltenen Fall einer Hämatombildung unter dem Dreieckshautlappen erfolgte eine Punktion unter Schonung des axialen Femoralgefäßes und des Implantates.

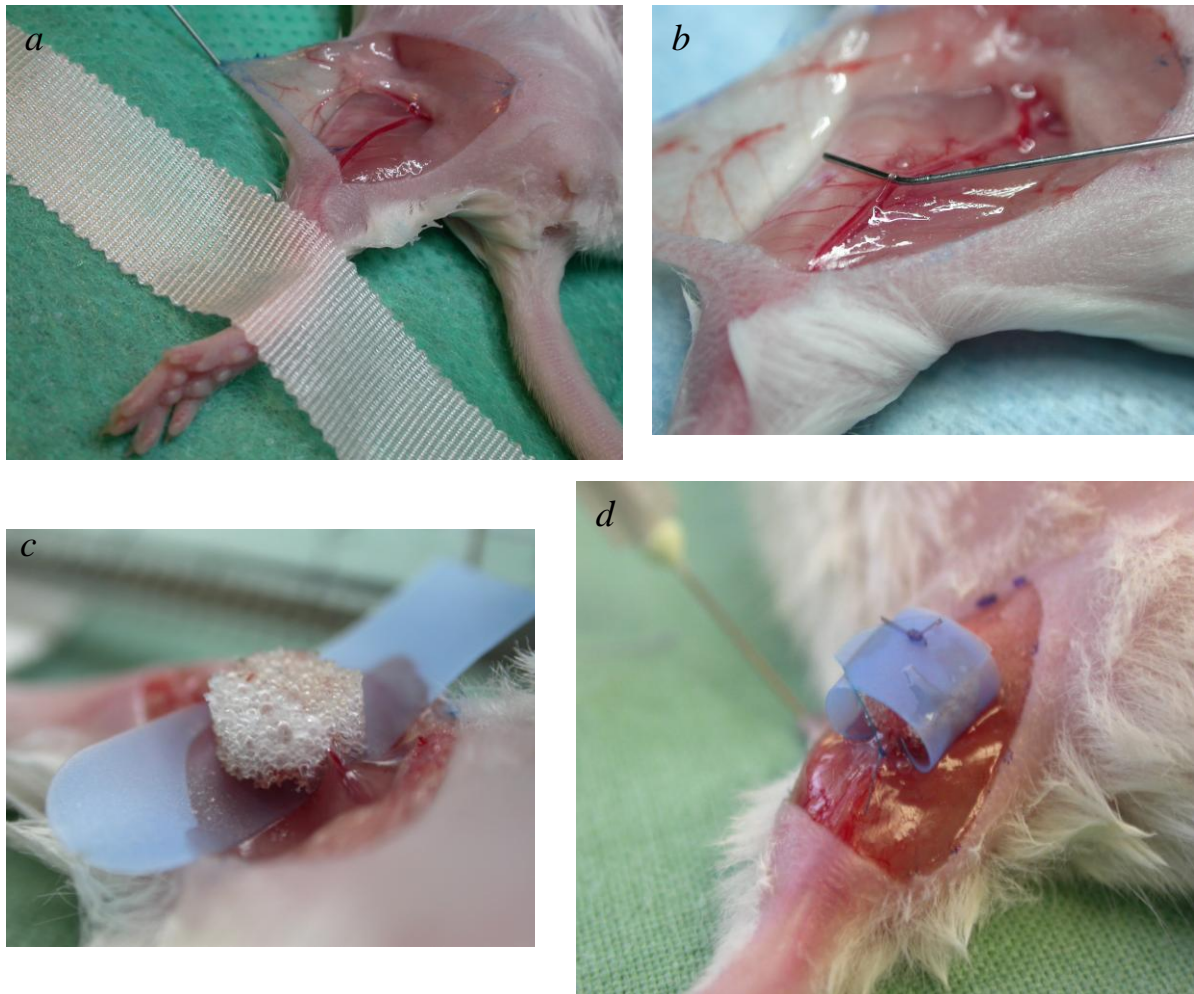


Abb. 10:

- a) Eröffneter OP-situs; der dreieckige Hautlappen wurde zurückgeschlagen und temporär fixiert. Das Inguinale Fett mit der superficiellen A. epigastrica inferior wurde stumpf nach kranial geschoben. Im axialen Verlauf des Schenkels zeigt sich das Gefäß-Nervenbündel.
- b) Ein Gefäßabschnitt ohne größere Seitenäste wurde über eine Strecke von ca. 8 mm aus der Gefäß-Nervenschide gelöst, der Nerv wurde in situ belassen. Mit einer stumpfen Kanüle vorsichtiges Anheben für die Implantat-Applikation;
- c) Abbildung des unbesiedelten, implantierten Scaffolds: das Gefäßbündel liegt in der vorgefertigten Kerbe des Scaffolds. Der Streifen Isolationsfolie wird im nächsten Schritt verschlossen werden.
- d) Isoliertes Scaffold aus der Ligaturgruppe: das Gefäß-, Nervenbündel wurde unmittelbar nach Austritt aus der Leitschiene mit einem Prolenefaden ligiert.
- e) Isoliertes Implantat kurz vor Hautverschluss.



Abb. 11:

Immunikompetentes Tier kurz vor Narkoseabschluss. Das linke Ohr wurde mit Lochstanz nach entsprechendem Zahlencode markiert. Interscapulär der verschlossene Zugang, durch welchen die Kontrollimplantate eingebracht wurden.

4.3.3. Euthanasie der Tiere mit Konstrukt-Explantation/Nachbereitung

Die Euthanasie der Versuchstiere fand entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit nach 1, 2, 3, 4, 6 bzw. 9 Wochen schnell und schmerzlos mittels einer Überdosis Pentobarbiturat statt. Für die Untersuchung der präfabrizierten Konstrukte folgte deren Entnahme: Lösung aus der Silikon-Isolation und Durchtrennung des Gefäßstiels.

4.4. Methoden der Auswertung

4.4.1 Makroskopie

Jedes Konstrukt an Hinterlauf, oder Rücken wurde noch in situ, sowie unmittelbar nach Explantation auf folgenden Kriterien hin begutachtet: Mögliche

- Formveränderung,
- Kapselbildung und den
- Vaskularisierungsgrad.
- Bei den Kontrollen interessierte vor allem evtl. Abweichen der Lage vom Ursprünglichen Implantationssitz.
- Bei den am Hinterlauf implantierten Konstrukten wurde zusätzlich die Durchgängigkeit des Durchflussgefäßes kontrolliert.

- Speziell im ersten Versuchsteil wurde auf die Durchgängigkeit des ligierten Gefäßstiel proximal der Eintrittsstelle in das Scaffold geachtet.
- Im zweiten Versuchsteil wurde zudem auf die Konsistenz des eingebrachten, heterologen Knorpels der besiedelten Konstrukte befundet.
- Schließlich wurde gestieltes Implantat mit Kontrolle aus demselben Tier direkt miteinander verglichen.

4.4.2 Mikroskopie/ Histologie

Fixieren:

Für histologische Untersuchungen wurden die Konstrukte unmittelbar post excisionem über Nacht in einer 4%igen Formaldehyd-Lösung in Phosphatpuffer (pH 7.0; nach Lillie 1954) bei Raumtemperatur konserviert.

Für Immunhistochemische Untersuchungen vorgesehene Konstrukte wurden für mindestens 30 Minuten in MEFO (Methanol-, Phosphatpuffer-, und Formalin-Gemisch, Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland) inkubiert, bevor sie dreimal je zehn Minuten in PBS Puffer gewaschen wurden. Auf eine 30 minütige Inkubation in 10% iger Sukrose folgte eine 30minütige Inkubation in 20%iger Sucrose bei Raumtemperatur. Schließlich wurde das Gewebe über Nacht in 30%iger Sukrose-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

Einbetten:

Die für die histologische Untersuchung vorgesehenen Konstrukte wurden im Institut für Pathologie, Klinikum München Rechts der Isar in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Der Alkohol wurde durch ein Intermedium (z.B. Xylol) entfernt und dann das Xylol durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Die von Paraffin durchtränkten Gewebestücke werden dafür in ein Gießschälchen gelegt, mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Paraffinblock verarbeitet, wobei die Einbettkassette den Blockträger bildet. Die Scaffolds wurden derart platziert, dass die Oberfläche der Sphärischen PU-Struktur auf dem Boden der Form zu liegen kam. Nach Erkalten des Paraffins wird der Block aus der Gießform geschlagen und bis zum Schneiden bei -20 °C tiefgefroren.

Für die Immunhistochemischen Untersuchungen wurden die in Sucrose fixierten Konstrukte in Tissue-Tek® O.C.T (Sakura Finetek, Zoeteroude/ Niederlande) eingelegt. Wieder wurde darauf geachtet die Konstrukte so einzubetten, dass die Sphärische Oberfläche der zukünftigen Schnittebene entspricht. Dabei wurden die Konstrukte die ersten sechs bis acht Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt und im Folgenden bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung eingelagert.

Schneiden:

Mit dem Rotationsmikrotom (HYRAX M55, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden von den Paraffinblöcken 7µm dünne Schnitte hergestellt.

Die in Tissue-Tek® O.C.T tiefgefrorenen Proben wurden zum Schneiden auf einen Metallblock gefroren und am Kryotom (Laica, CM) geschnitten (Einstellungen: Kammertemperatur – 20°C; Blocktemperatur – 25°C; Schnittdicke 10-15 µm).

Da für die Auswertung vor allem der Zustand im Zentrum und an der Oberfläche der Implantate relevant waren, wurden die Blöcke so eingespannt, dass die Klinge parallel zur Konstruktoberfläche zu schneiden kam. Jedes Präparat wurde bis mindestens zur Mitte angeschnitten (Abb. 12). Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Fa. Menzel, München, Deutschland) aufgezogen und sortiert.

Die Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden in einem 37 °C warmen Brutschrank getrocknet und bis zum Färben bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Objektträger mit den Tissue-Tek® O.C.T Schnitten wurden bis zum zum Färben bei -20 °C aufbeahrt.

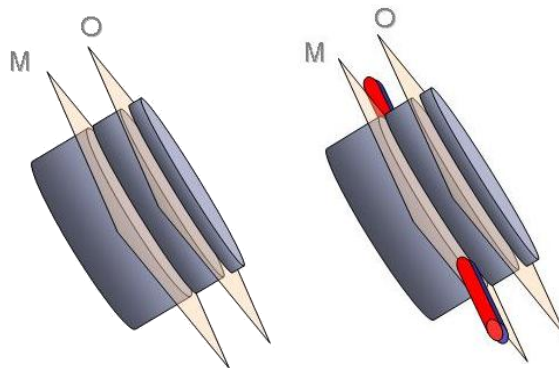


Abb. 12:

Schematisierte Darstellung vom Kontroll- Konstrukt links und Konstrukt mit axial durchfließendem Gefäßbündel. O kennzeichnet einen oberflächlich entnommenen Schnitt, M steht für einen Schnitt entnommen aus der Konstruktmitte.

*Färben:*Unspezifische Färbung

Die auf den Objektträgern getrockneten Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert, durch die absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt, mit destilliertem Wasser gespült und schließlich in den jeweiligen Färbelösungen gefärbt.

HE-Färbung (Hämalaun nach Mayer) (Tab. 6)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde zur morphologischen Beurteilung, sowie morphometrischen Beurteilung der Neovaskulären Prozessen innerhalb der Explantate durchgeführt. Dabei färben sich die Zellkerne blau, alle anderen Strukturen in Rottönen. Die Schnitte wurden für zehn Minuten in einer sauren Hämalaunlösung (nach Mayer/Romeis §648, Apotheke Klinikum München Rechts der Isar) angefärbt. 20 Minuten lang wurden die Schnitte danach unter fließendem Wasser gebläut, fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült und drei Minuten mit 1%-igen Eosin-Plasmafarbstoff (Apotheke, Klinikum München Rechts der Isar) eingefärbt. Abschließend, gründliche Spülphase unter Leitungswasser und Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland).

Tab. 6:

Färbeprotokoll für HE-Färbung nach Mayer

SCHRITT	MEDIUM	Zeit [min]	FUNKTION
1.	Xylol	5	Entparaffinieren
2.	Xylol	5	Entparaffinieren
3.	Isopropanol rein	2	Bewässern
4.	Isopropanol 95%	2	Bewässern
5.	Isopropanol 80%	2	Bewässern
6.	Isopropanol 70%	2	Bewässern
7.	Aqua dest	5	Bewässern
8.	Hämalaun	10	Kernfarbstoff
9.	fließendes Leitungswasser ca. 37°C	20	Bläuen
10.	Aqua dest	5	Spülen
11.	Eosin (1%) + 3 Gtt. Eisessig	3	Plasmafarbstoff
12.	Aqua dest	5	Spülen
13.	Isopropanol 70%	0:05	Entwässern
14.	Isopropanol 80%	0:05	Entwässern
15.	Isopropanol 95%	0:05	Entwässern
16.	Isopropanol rein	2	Entwässern
17.	Xylol	5	Intermedium
18.	Xylol	5	Intermedium

Azan-Färbung (NOVUM – FÄRBUNG NACH GEIDES) (Tab. 7)

Die Azanfärbung wurde zur Darstellung der Kollagenfasern gewählt; Zellkerne (Chromatin) und das Zytoplasma färben sich dabei rot, Glia rötlich, Schleim blau, Kollagen- und Retikuläre Fasern dunkelblau.

Die Schnitte wurden für fünfzehn Minuten in einer Kernechtrot-Lösung angefärbt. Für diese Lösung wurden 0,2 g Kernechtrot (Apotheke Klinikum München Rechts der Isar) in 100ml 5%iger, wässriger Aluminiumsulfatlösung (Apotheke Klinikum München Rechts der Isar) durch kurzes Aufkochen gelöst und nach dem Erkalten filtriert. Zwischen zwei weiteren Spül-Durchgängen wurde das Bindegebe mit fünfprozentiger, wässriger Wolframatophosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gebeizt. Für die anschließende Färbung des Bindegewebes mit einem Anilinblau-Orange-Gemisch für acht Minuten, wurden 0,5 g Anilinblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 2,0 g Goldorange G (Fa. Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, nach der Zugabe von 8 ml Eisessig (Apotheke Klinikum München Rechts der Isar) kurz aufgekocht und in erkaltetem Zustand filtriert. Abschließend folgte eine gründliche Spülung unter Leitungswasser und Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland).

Tab. 7:

Färbeprotokoll – Azanfärbung nach Geides

SCHRITT	MEDIUM	Zeit (min)	FUNKTION
1.	Xylol	5	Entparaffinieren
2.	Xylol	5	Entparaffinieren
3.	Isopropanol rein	2	Bewässern
4.	Isopropanol 95%	2	Bewässern
5.	Isopropanol 80%	2	Bewässern
6.	Isopropanol 70%	2	Bewässern
7.	Aqua dest	5	Bewässern
8.	Kernechtrot	20	Kernfarbstoff
9.	Aqua dest	1	Spülen
10.	Wolframatophosphorsäure (5%)	15	Bindegewebe entfärben/ beizen
11.	Aqua dest	1	Spülen
12.	Anilinblau-Orange-Gemisch	8	Bindegewebsfarbstoff
13.	Aqua dest	1	Entwässern
14.	Isopropanol rein	0:15	Entwässern
15.	Xylol	1	Entwässern
16.	Xylol	1	Entwässern
17.	Xylol	1	Intermedium

Spezifische Färbung

Immunhistochemie COLLAGEN II

Um Kollagen Typ II nachzuweisen, kam die sogenannte StreptABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) zum Einsatz. Dafür wird ein Brücken-, bzw. Sekundärantikörper verwendet, welcher biotinyliert ist und an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Als wasserlösliches Vitamin koppelt Biotin gut an Brückenantikörper und stellt somit die Verbindung im ABC-Komplex her. Der immunologische Nachweis mit der streptABC-Methode gilt als hochsensitiv.

Zum Einsatz kam der ready to use – Reagenzienkit HRP 060 ZytoChemPlus, Ref./Cat.No. 503-5631 (Fa. Zytomed Systems, Berlin, Deutschland). Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Maus IgG2a-kappa-Antikörper aus dem Klon SPM239.

Die im Kit enthaltene AEC-solution dient in Kombination mit der Merrettich-Peroxidase (HRP) als Chromogenlösung und markiert durch einen Oxidationsprozess das Zielantigen Kollagen II mit einem rostroten Präzipitat. Die Auswertung der detektierten Bereiche ist lichtmikroskopisch möglich. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurde für den verwendeten Primär-Antikörper die optimale Verdünnung (1: 100) ermittelt. Es wurden positive und negative Gewebekontrollen mitgefärbt, um die Sensitivität und Spezifität der Antikörperbindung zu prüfen.

Vor der Färbung werden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem PAP-Pen (Fa. DakoCytomation GmbH, Deutschland) eingekreist, um das aufgetragene Medium auf den Schnitt zu begrenzen. Für eine gleichmäßig, intensive Färbung wurde während der gesamten Prozedur darauf geachtet, dass die Schnitte dunkel, feucht und horizontal lagern. Das allgemeine Prozedere für die Sucrose-fixierten Schnitte ist in Tabelle 8 beschrieben; dabei werden Collagen II, bzw. PBS zu je 200 µl auf jeden Schnitt pipettiert; von den restlichen Reagenzien werden jeweils zwei Tropfen auf jeden Schnitt aufgetragen.

Eindecken

Zur mikroskopischen Untersuchung und zur Konservierung der Schnitte wurden die gefärbten Präparate manuell mit Eindeckmittel und Deckglas versiegelt. Für die Immunhistochemischen Schnitte wurde phasenaequivalent wässriges Aquatex (Fa.

Harleco, Lawrence/ USA) verwendet; die Azan- und HE-gefärbten Schnitte wurden mittels Eukitt® (Fa. Sigma Aldrich/ Unterschleißheim, Deutschland) eingedeckt.

Tab. 8:

Immunhistochemisches Färbe-Protokoll für Collagen II

SCHRITT	MEDIUM	Zeit(min)	FUNKTION
1.	PBS	5	Reinigung
2.	Pepsin (Fa. Zytomed/ Berlin, Deutschland)	10 – 15	Spaltung von Peptidbindungen
3.	PBS	3x1	Reinigung
4.	Blocking Agent	5	Sättigung unspezifischer Proteine
5.	Abklopfen		Entfernung von Reagenz-Resten
6.	Collagen II	60	Primärantikörper
7.	PBS	3x1	Reinigung
8.	Sekundärantikörper	2 x 10	Sekundärantikörper
9.	Abklopfen		Entfernung von Reagenz-Resten
10.	Konjugat	2 x 10	HRP
11.	PBS	3x1	Reinigung
12.	AEC Farbstoff	2 x 5	Substrat-, Chromogenlösung
13.	fließendes Leitungswasser ca 37°C	2	Bläuen
14.	Hämalaun nach Mayer	8 min	Gegenfärben
15.	Auqa dest	5 min	Bläuen

Auswertung

Pro Konstrukt und Färbung wurden je zwei 5µm dicke Schnitte parallel zur Gefäßachse - mittig und randständig - mit dem Lichtmikroskop begutachtet. Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Polykandriotis et al. (Polykandriotis E 2006): Jeder runde Konstrukt-Querschnitt wurde in neun fiktive Sektoren unterteilt - drei Reihen, drei Spalten (Abb. 13). In schwacher Vergrößerung wurde mittels Excel-Tabelle festgehalten, ob die einzelnen Sektoren Gewebe beinhalten. In jedem mit Gewebe gefüllten Sektor wurde anschließend in 100-facher Vergrößerung die Anzahl der Gefäßlumina in einem zufällig gewählten Gesichtsfeld gezählt.

Die Auswertung erfolgte in randomisierter, verblindeter Reihenfolge durch eine Person. Schließlich wurden die Schnitte histomorphometrisch im Hinblick auf

- Zelltypen,
- Wachstumsform und
- Zustand des Polymerscaffolds begutachtet.

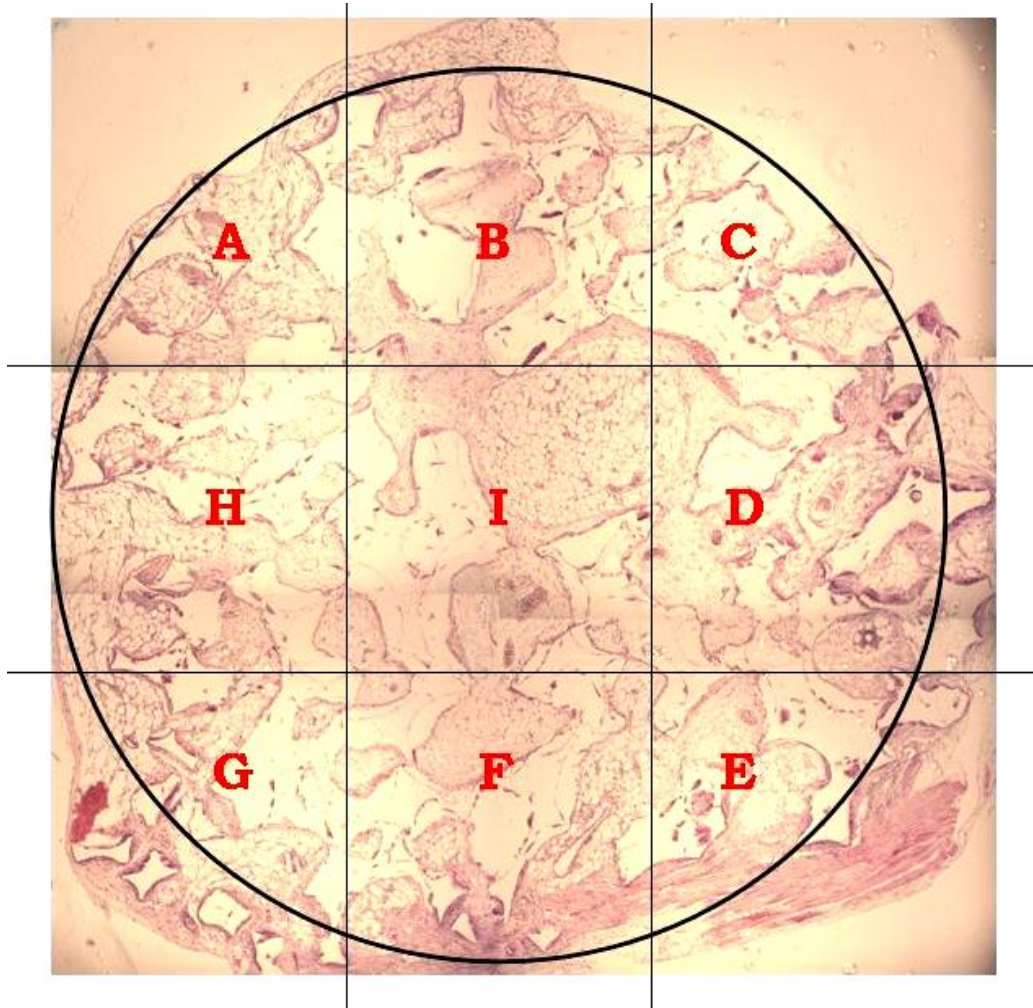


Abb. 13:

Histologisch aufgearbeiteter Skaffold-Querschnitt (einzelne Abschnitte in 0,6 facher Vergrößerung und digital zusammengesetzt.) für die standardisierte Auwertung: Aufteilung in 9 fiktive Sektoren (A-E). Jeder einzelne Sektor wurde auf Gewebefüllung überprüft. In jedem Gewebe-gefülltem Sektor wurde mittels Zufallsprinzip in einem Areal mit 100facher Vergrößerung die Anzahl angeschnittener Gefäße ausgezählt.

4.4.3 Statistische Analysen

Alle Tests wurden auf dem Signifikanzniveau von 5% mit dem Statistikpaket SPSS Version 16.0 durchgeführt. Die Statistik wurde ohne fehlende Werte für abhängige Variablen erstellt. Mit dem Mann-Whitney U-Test wurde einseitig paarweise auf den erwarteten Unterschied hin getestet.

Statistische Auswertung von Versuch 1:

Quantitative Auswertung der primär unbesiedelt impantierten Scaffolds bezüglich Einwachsen von Gewebe in-vivo :

- Untersuchung der Durchfluss-Konfiguration sowie Ligatur Konfiguration in Abhängigkeit von Zeit
- Untersuchung der Implantatoberflächen versus Implantat-Mitte

Quantitative Auswertung der Gefäßanschnitte innerhalb der, mit neuem Gewebe gefüllten Leitschienen:

- Trendentwicklung in Abhängigkeit der „In-vivo Verweildauer“:
- Untersuchung der Durchfluss-Konfiguration versus Ligatur Konfiguration
- Untersuchung der Implantatoberflächen versus Implantat-Mitte

Statistische Auswertung von Versuch 2:

quantitative Auswertung der Knorpelgewebs-Menge innerhalb der mit humanem, bzw. bovinem Knorpel besiedelten Leitschienen:

- Untersuchung der Implantatoberflächen versus Implantat-Mitte
- Untersuchung in Abhängigkeit von Zeit

5. Ergebnisse

5.1 Biokompatibilität *in vitro* und Besiedlungsmuster

Das Besiedlungsmuster der im zweiten Versuchsschenkel verwendeten Leitschienen wurde bezüglich Biokompatibilität, bzw. Vitalität und Verteilungsmuster der Zellen überprüft.

Vor dem in-vivo Einsatz der besiedelten Konstrukte wurden vereinzelte Scaffolds stichprobenartig aus den Zellkulturflaschen entnommen und mittels Live-dead-assay untersucht: die dreidimensionale Betrachtung der Scaffolds zeigte nach einer Zellfärbung mit einer gleichmäßig dichten Zellbesiedlung und mehrheitlicher Vitalität auf der gesamten Oberfläche der Implantate. Nach Längs- und Querhalbierung der Leitschienen wurde das gleiche Muster im Inneren beobachtet.

5.2 In-vivo Versuchsablauf

5.2.1 Implantation und postoperative Beobachtungszeit:

Die Eingriffe dauerten durchschnittlich zwischen 25 - 50 Minuten und konnten ohne intraoperative Zwischenfälle durchgeführt werden.

Es gab keine anästhesiebedingten Ausfälle. Ebenso wenig mussten Tiere wegen unvorhergesehener operativer Zwischenfälle (z.B. unstillbare Blutung) euthanasiert werden. Alle Mäuse erwachten ohne Zwischenfall aus der Narkose.

Während der intensiven Kontrollen der Tiere nach dem Eingriff mussten für keines der Tiere negative Veränderungen im Bezug auf Körperhaltung, Gang, Verhalten, Haarkleid oder Belastungseinschränkung, bzw. Durchblutungsstörung der Extremität vermerkt werden: die Mäuse wiesen bereits am ersten postoperativen Tag ein weitgehend unbeeinträchtigtes Aktivitätsprofil mit regelmäßiger Futter- und Wasseraufnahme auf. Auf die operierten Gliedmaßen wurde volle Last aufgenommen. Das Gangmuster unterschied sich nicht von dem Gangmuster gesunder Tiere. Auch im Sozialverhalten zeigte sich keine Beeinträchtigung, die Tiere nahmen Spiel- und Komfortverhalten wie vor der Operation wieder auf.

5.2.2 Komplikationen und Ausfälle

Die längste Überlebensanforderung dieses Experimentes belief sich auf 6 Wochen belief und die Tiere wurden nach abgeschlossenem Wachstum, d.h. mit ca. 7 Wochen in den Versuch integriert; wie zu erwarten war, mussten während des gesamten Versuchs keine systemischen, nicht Versuchs-abhängigen, altersassoziierten Krankheiten verzeichnet werden.

Versuch 1:

- Zwei Tiere (Durchflussgruppe, Woche 1 und Ligaturgruppe Woche 9 verstarben innerhalb der ersten postoperativen Stunden aus ungeklärten Gründen.
- wegen schlechtem Sitz der isolierenden Silikonfolie wurde das Hinterlaufkonstrukt eines Tieres aus der Ligaturgruppe aus der Wertung genommen.

Versuch 2:

- Bei einem der Tieren aus der 1- wochen Gruppe der mit Chondrozyten besiedelten Implantaten bovinen Ursprungs und 2 Tieren aus der 6- wochen Gruppe der mit Chondrozyten besiedelten Implantaten bovinen Ursprungs zeigte sich im Verlauf eine dehizente Weichteildeckung nahe der Nackenkontrolle, so dass das Implantat trotz erfolgreichem Wundverschluss aus der Wertung genommen wurde.

Ebenso wurde mit 2 Hinterlauf- Implantaten verfahren: Je ein Hinterlauf- Implantat der Bovinen Woche 6 und 1 Gruppe wurden aus oben genanntem Grund aus dem Experiment ausgeschlossen.

5.3 Makroskopie:

Die Makroskopische Beurteilung der Konstrukte noch in situ (Hinterlauf oder Nacken), sowie unmittelbar nach Explantation ergab im Hinblick auf folgende Kriterien:

Versuch 1:

- *Formveränderung*: Bis auf kleine Veränderungen, wie z.B. Kantenabrundungen waren an den explantierten Leitschienen keine wesentlichen Abweichungen der ursprünglich diskoiden Form festzustellen.
- *Kapselbildung*: bei je zwei Tieren aus beiden Konfigurationsgruppen (Durchfluss- und Ligaturgruppe) fand sich eine fibrotisch indurierte Kapsel um das isolierte Implantat am Hinterlauf. An den Kontrollimplantate dieser Tiere war es zu keiner Kapselbildung gekommen.
- *Vaskularisierungsgrad*: In allen Tieren präsentierten sich die Kontrollen im Gegensatz zu den gestielten Konstrukten deutlich blasser und mit nur vereinzelt, oberflächlichem Gefäßverlauf. Die Konstrukte des Hinterlaufs zeigten sich makroskopisch gleichmäßig rötlich durchsetzt (Abb. 14).
- *Durchgängigkeit des Durchflussgefäßes* der am Hinterlauf implaniterten Konstrukte: Ein insuffizienter Gefäßstil zeigte sich in der Durchflussgruppe bei einem Tier nach vier Wochen.
- *Perfusion des ligierten Gefäßstils* proximal der Eintrittsstelle in das Skaffold: Während der Explantation wurde bei vier von 17 Tieren der Ligatur-Gruppe makroskopisch ein insuffizienter axialer Pedicle festgestellt, was unter dem Operationsmikroskop verifiziert werden konnte und in einem Ausschluss aus der Wertung resultierte.
- *Kontrollen*: alle Leitschienen waren in lockerem Bindegewebe subkutan am ursprünglich platzierten Ort verankert; die poröse Skaffold-Oberfläche war durchwegs stark mit der Subkutis verwachsen, während der Kontakt zwischen Leitschiene und nuchaler Muskelfaszie eher locker ausgeprägt war.

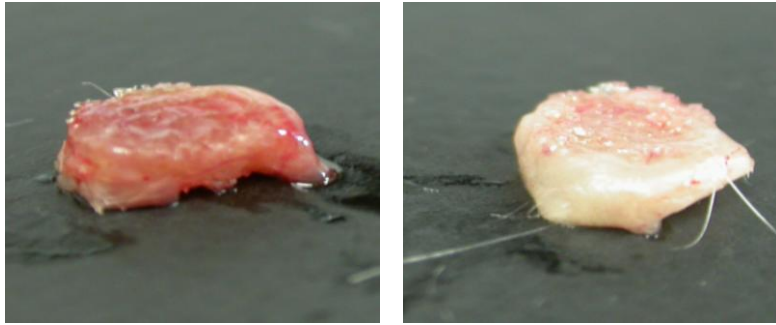


Abb. 14:

Unmittelbar explantierte, ursprünglich unbesiedelte Scaffolds im makroskopischen Vergleich nach einer in-vivo Verweildauer von drei Wochen: Links: Implantat aus der Ligatur-Gruppe: deutliche Gefäßinfiltration; Rechts: Kontrollimplantat mit vereinzelt Neo-gefäßen.

Versuch 2:

- *Formveränderung*: siehe Versuch 1
- *Kapselbildung*: Keines der Implantate wies nach Explantation eine Kapselbildung auf.
- *Vaskularisierungsgrad*: In allen Tieren präsentierten sich die Kontrollen im Gegensatz zu den gestielten Konstrukten deutlich blasser und mit nur vereinzelt, oberflächlichem Gefäßverlauf. Die Konstrukte des Hinterlaufs zeigten sich makroskopisch rötlich durchsetzt, wenn auch nicht in gleicher Intensität wie die initial unbesiedelten Implantate aus Versuch 1 (Abb. 15).
- *Konsistenz des eingebrachten, heterologen Knorpels der besiedelten Konstrukte*: Im Vergleich zum status prä implantationem ließ sich mit einer kursorisch manuellen Untersuchung kein Unterschied bezüglich Konsistenz der Explantate feststellen. Ein Unterschied war lediglich im direkten Vergleich der unbesiedelten mit den chondrozytär besiedelten Scaffolds zu tasten; letztere imponierten knorpeltypisch derb.
- *Implantat-Lage*: Sowohl die Kontroll-Implantate, als auch die Implantate am Hinterlauf waren bei Explantation, soweit makroskopisch beurteilbar nicht wesentlich vom ursprünglichen Implantation-situs abgewichen.

- *Durchgängigkeit der Durchflussgefäße der Hinterlauf-Konstrukte:* sämtliche Hinterlauf- Implantate zeigten sich bei Explantation durchgängig.
- *Kontrollen:* die Skaffold-Oberfläche war im Vergleich zu Versuch 1 weniger stark mit der Subkutis verwachsen; der Kontakt zwischen Leitschiene und nuchaler Muskelfaszie war ähnlich locker ausgeprägt. In drei Fällen kam es im Verlauf zu einer Weichteildehiszenz nahe der Kontroll-Implantation, was auf evtl. auf die reduzierte Stabilität der Haut bei fehlender Behrnung zurückzuführen ist.
- *Konsistenz der mit Knorpel besiedelten Konstrukte:* bei dezentem Druck zwischen den Fingerspitzen zeigte sich eine prallelastische Konsistenz, die sich im grobkursorischen Vergelich mit der Konsistenz deckte, die kurz vor Skaffold-Implantation ermittelt worden war.
- *Direkter Vergleich zwischen Kontrolle und Hinterlauf-Implantat aus demselben Tier:* auffallend war der Unterschied hinsichtlich Vaskularisierung (siehe oben).

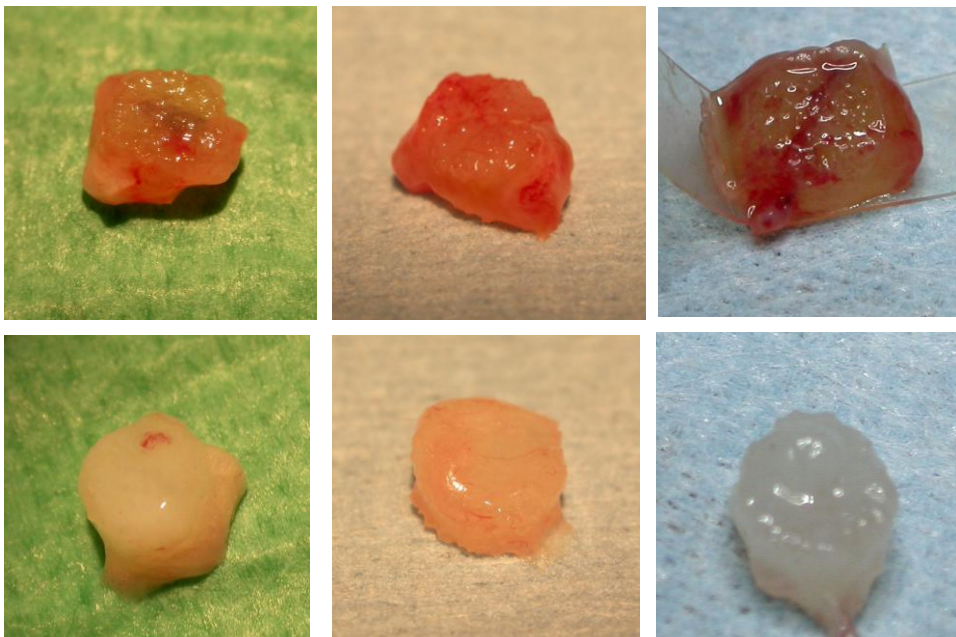


Abb. 15:

Obere Reihe: Extremitäten Implantate von Links nach Rechts: mit bovinen Chondrozyten besiedeltes Explantat nach einer Woche in-vivo Verweildauer; der Gefäßstiel imponiert zentral als dunkles Areal. Oben Mitte: mit bovinen Chondrozyten besiedeltes Explantat nach sechs Woche in-vivo Verweildauer; bei ca. „fünf Uhr“ imponiert der ehemalige Gefäßstiel-Austrittspunkt als rötlicher Bereich. Oben rechts: Mit Humanen Chondrozyten besiedeltes Skaffold nach einer in-vivo Verweildauer von sechs Wochen; das Durchflussgefäß ist gut erkennbar. Untere Reihe: dazugehörigen Nacken-Kontrollen.

5.4. Mikroskopie/Histologie

histomorphometrische Beurteilung

Die Untersuchung der Schnitte im Hinblick auf Zelltypus, Wachstumsform und Zustand des Polymers erbrachte Folgendes:

Ein Abbau des Polymers war in keinem der Präparate zu keinem Zeitraum zu erkennen. Es gab keine Hinweise auf Resorption oder Degradation der Polymerschäume als Ausdruck chemischer Auflösungsprozesse.

Versuch 1:

Es fanden sich zytomorphologisch, mit zunehmender in-situ Verweildauer in den leer implantierten Scaffolds: zahlreichen Fibrinfasern, vereinzelt Monozyten, z.T. in Kontakt mit Thrombozyten. Innerhalb der Kontrollen dominierten Adipozyten als vorherrschender Zelltypus.

Überall dort, wo das Polymer nicht mit kompaktem Gewebe gefüllt war, bzw. wo Entzündungsgewebe und Sekret dominierte, kam es im Rahmen der Aufarbeitung (Schneiden mit dem Rotationsmikrotom) zur Kompression der „leeren“ Poren, bzw. zum Zerreißen der Polymerstege (Abb. 16).

Kontrollimplantate der Nackenregion:

Die subkutanen Präparate der in-vivo -Verweildauer von einer Woche wiesen kaum zellulären Inhalt auf. Die Poren beinhalteten hier vorwiegend klares Sekret und an den Übergängen zum Biomaterial vereinzelt Riesenzellen, Granulozyten, Mastzellen und Lymphozyten. In den Kontrollpräparaten der Tiere der zwei Wochen Gruppe hingegen sind bereits großflächige Inseln von Binde- und Fettgewebe zu erkennen (Abb. 17). Nach drei, bzw. vier Wochen sind die Poren des Kontroll-Scaffolds bei allen Präparaten komplett Gewebe, vor allem mit Fettgewebe, gefüllt.

Gefäß-gestielte Implantate des Hinterlaufs mit Isolation

Bei den gefäßgekoppelten Implantaten ist nach ein und zwei Wochen in-vivo Verweildauer noch keine deutliche Gewebefüllung der Poren zu erkennen.

Die Präparate des *Ligaturmodells* präsentieren sich nach ein und zwei Wochen, teilweise auch nach drei Wochen innen noch „leer“. Auffallend ist hier die Füllung der Poren mit klarem Sekret und vorrangig randständigen Entzündungszellen, wie Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten Mastzellen gefüllt.

Vor allem davon betroffen zeigten sich die Präparate, bei denen bereits makroskopisch ein thrombosierter Gefäßstil festgestellt werden konnte. Dieses Bild zeigen die Präparate des Ligaturmodells nach einer Verweildauer von vier Wochen nicht mehr. Eine gänzliche Füllung der Poren ist jedoch bei der überwiegenden Anzahl der Präparate noch nicht zu postulieren (Abb.18). Nach 9 Wochen Implantatverweildauer stellt sich eine durchgehende homogene bindegewebige Situation dar. Die Polymerporen sind komplett befüllt und mit Gefäßen durchsetzt. Größere entzündungsspezifische Areale sind nicht mehr vorhanden (Abb.19 und 19a).

In den Präparaten der *Durchflussmodell*- Gruppe ist bis zu einer Verweildauer von 2 Wochen im Tier keine vollständige Durchwachsung des Polymers zu vermerken (Abb. 20). Das Mikroskopische Bild bestimmt Granulationsgewebe als normale Fremdkörperreaktion auf das Polymer.

Die Dichte eingewachsenen Gewebes nimmt mit Verweildauer des Implantates im Tier zu: Präparate der 4 Wochen Gruppe sind meist komplett „durchwachsen“ (Abb. 21). Nach einer 9-wöchigen Implantat-Verweildauer sind die Poren homogen mit dichtem Bindegewebe gefüllt und es hat sich ein fester Verbund zwischen Polymer und Gewebe entwickelt (Abb. 22).

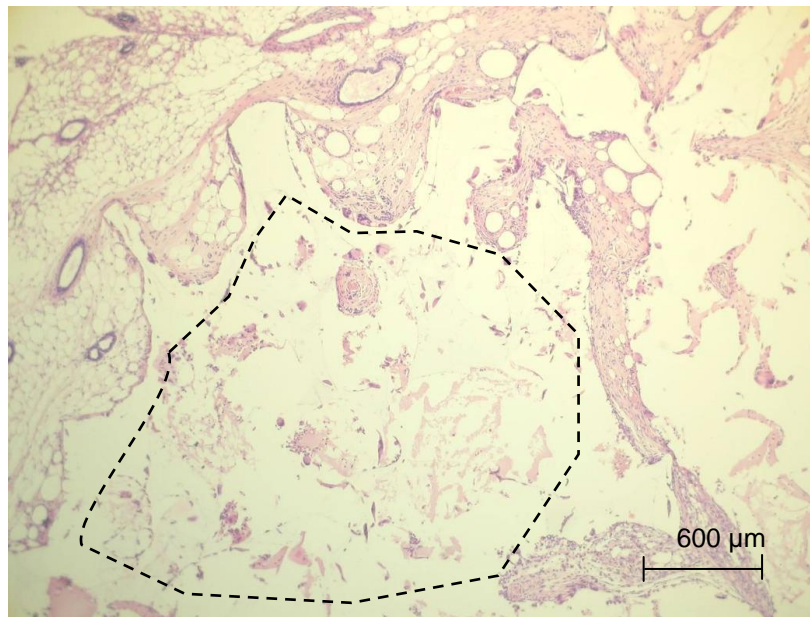


Abb. 16:

Ligatur-Präparat nach 3-wöchiger Verweildauer im Tier. Mit gestrichelter Linie ist ein Areal markiert, in welchem das Präparat zerissen ist. Dies ist als Artefakt zu werten, da es bei mangelnder Gewebefüllung, wie hier vor allem in Form von Sekret und vereinzelt Entzündungszellen ergo mangelnder Stabilität innerhalb der Leitschiene während des Schneidevorgangs zu Ruptur der Stege des Polymerscaffolds kommt.



Abb. 17:

Ausschnitt aus subkutan, nuchal gelegenen Kontrollpräparat nach „in-vivo Verweildauer“ von 2 Wochen: großflächige Füllung von Binde- und Fettgewebe. Polymerspindeln (exemplarische Markierung mit gestrichelter Linie) sind zwischen den gefüllten Poren (exemplarische Markierung mit gepunkteter Linie) deutlich zu erkennen. Die Interkonnektivität der Poren ist gut sichtbar. Die Pfeile markieren vereinzelte angeschnittene Blutgefäße mit Erythrozyten- Füllung.

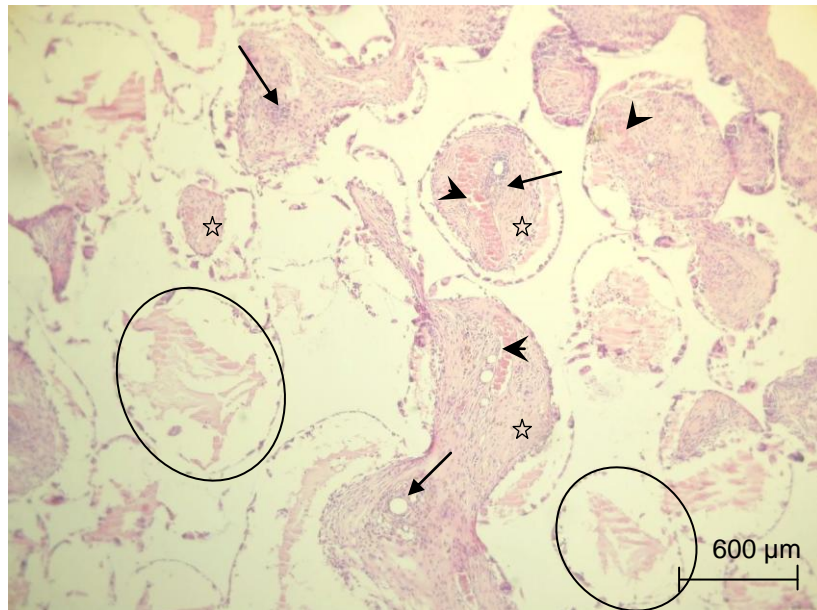


Abb. 18:

Ligatur-Präparat nach 4-wöchiger Verweildauer im Tier. Eine gänzliche Befüllung der Poren mit ist noch nicht durchgängig sichtbar, zahlreiche Poren weisen eine Füllung mit klarem Sekret auf (Exemplarische Kreismarkierung). Intermittierend „Nester“ mit Entzündungszellen (Pfeilmarkierungen) und Bindegewebe (Sternmarkierung). Die Pfeilspitzen zeigen vereinzelt Anschnitte von Blutgefäßen mit Erythrozytärer Füllung auf.

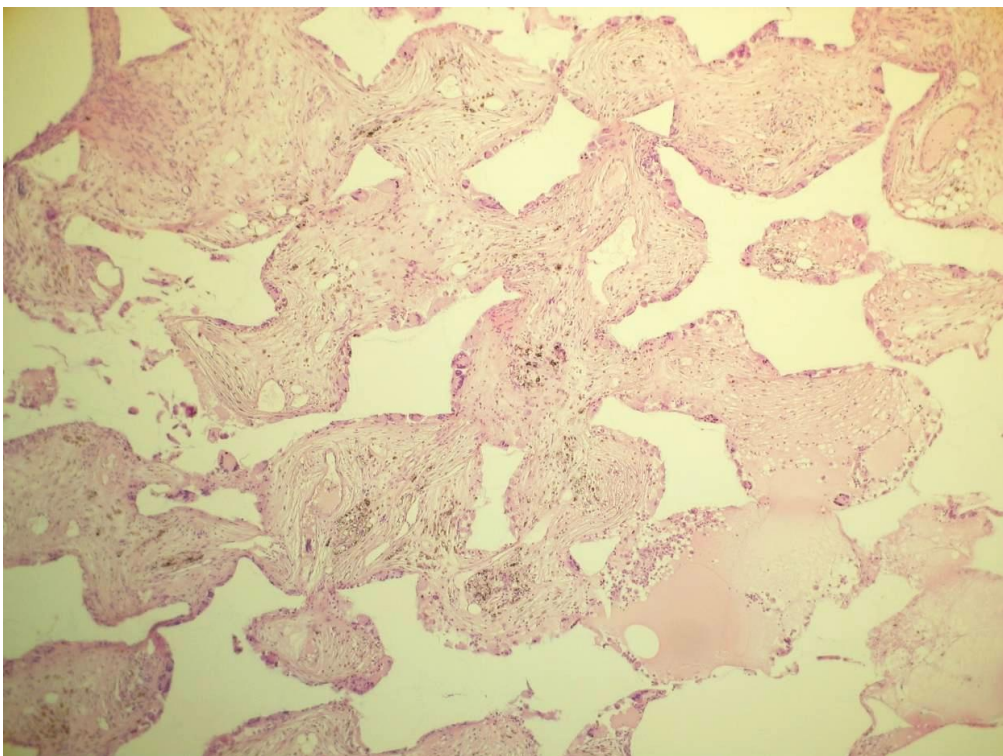


Abb. 19:

Ligatur-Präparat nach 9-wöchiger Verweildauer im Tier. Das Bindegewebe hat die Poren größtenteils komplett ausgefüllt; Es treten keine Riss-artefakte mehr auf. Eine dichte Verteilung von neu eingesprossenen Gefäßen ist deutlich erkennbar.

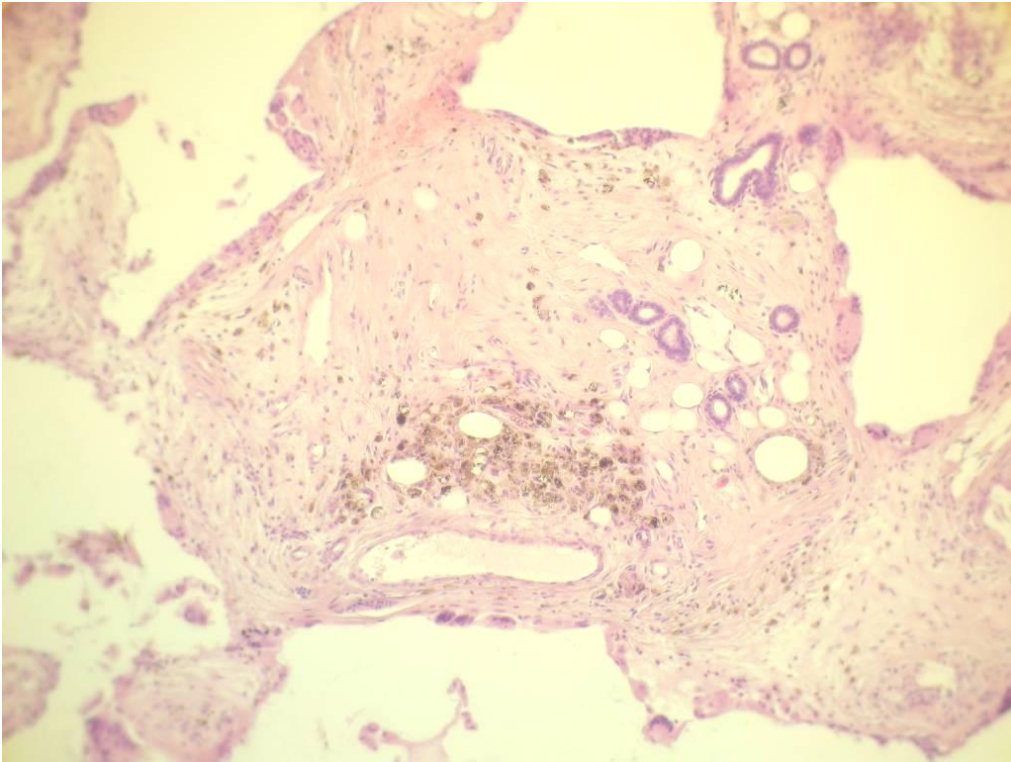


Abb. 19a:

Ligatur Präparat nach 9-wöchiger Verweildauer im Tier mit Zahlreichen Neogefäßen.

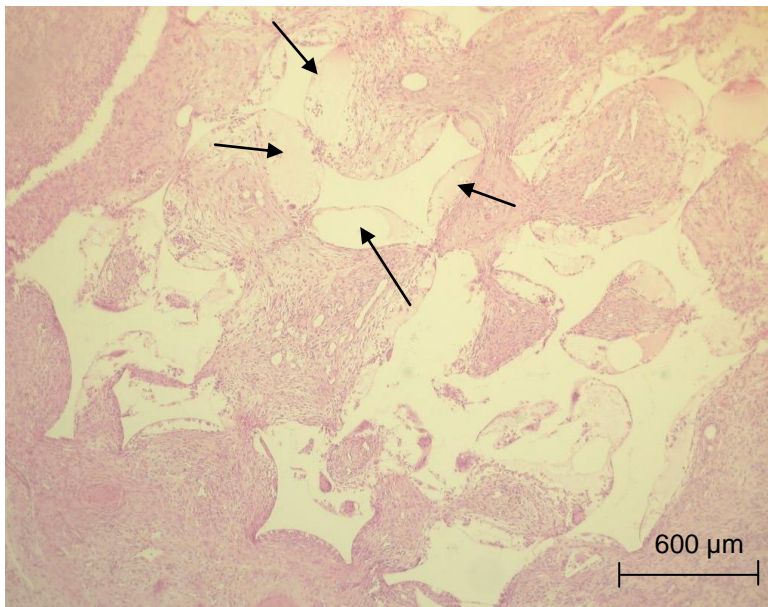


Abb. 20:

Durchfluss-Präparat nach 2-wöchiger Verweildauer im Tier. Vom Rand ausgehend ist eine relativ gleichmäßige Gewebe-Infiltration, zu sehen die sich hauptsächlich aus bindegewebigen Strukturen zusammensetzt. Diverse Poren weisen an den Rändern Sekret auf (Pfeilmarkierung).

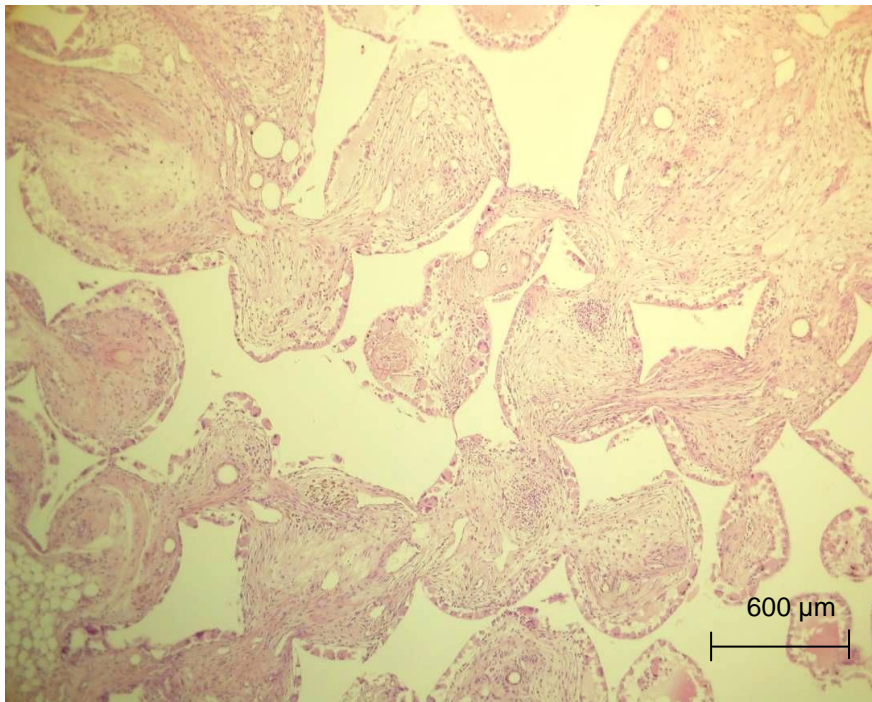


Abb. 21:

Durchfluss-Präparat nach 4-wöchiger Verweildauer im Tier. Lockeres Bindegewebe hat die Poren nun gänzlich ausgefüllt.

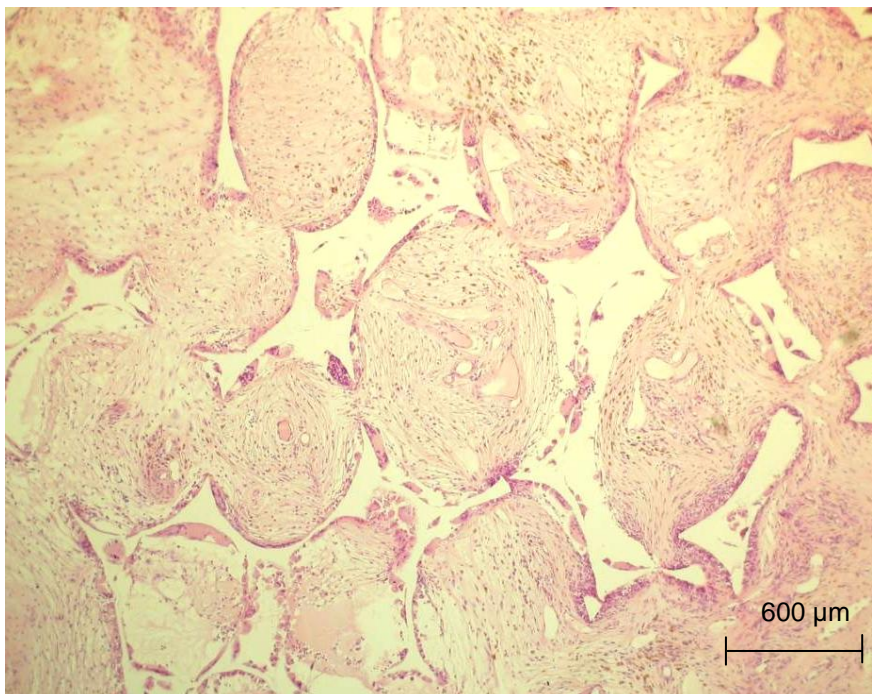


Abb. 22:

Durchfluss-Präparat nach 9-wöchiger Verweildauer im Tier. Polymerporen sind vollständig mit Bindegewebe durchsetzt.

Versuch 2:

Insgesamt zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen humanen und bovinen Chondrozyten; im Vergleich zu bovinen Chondrozyten neigten humane Chondrozyten im Implantat unter gleichen Bedingungen verstärkt zu bindegewebigem Umbau. Ein Unterschied bezüglich Persistenz sowohl humaner, als auch boviner Chondrozyten ließ sich bereits nach einer in-vivo Verweildauer von 1 Woche feststellen.

Kontrollimplantate der Nackenregion:

Die subkutanen Präparate wiesen nach 1-wöchiger in-vivo -Verweildauer im Leitschienen-Zentrum einen Zellverlust auf (Abb. 23). Drastischer zeigte sich dieser nach in-vivo Verweildauer von 6 Wochen. Hier fanden sich Komplett-Verluste der ursprünglichen Knorpelzellfüllung mit teilweiseem Ersatz durch bindegewebige Strukturen, wie Fibrinfasern, vereinzelt Monozyten, z.T. in Kontakt mit Thrombozyten. Eine adipozytäre Durchsetzung war nirgends zu erkennen. Die Persistenz der Knorpelzellen an der Leitschienen Oberflächlich der Kontrollen präsentierte sich höchst variabel und reichte, sowohl in der 1-Wochen-, als auch 6-Wochen Gruppe von bindegewebiger Durchbauung bis hin zu Extrazellulärem- und Hyalinem Reichtum im Sinne einer Knorpeligen Befüllung. Abgesehen davon, dass verstärkt humane Chondrozyten zu Ersterem neigten ließ sich dieses Phänomen auf keine speziellen Faktor oder stetes Muster zurückführen.

Implantate des Hinterlaufs mit axialem Durchflussgefäß und Isolation

Vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem ersten Versuch war im unmittelbaren Umfeld des Durchflussgefäßes stets umfangreich Gewebe, Knorpel-, aber auch Bindegewebe vorhanden.

Ebenso fiel auf, dass die Oberflächen-Schnitte vor allem zentral teilweise „leer“ erschienen; eine Substitution der untergegangenen (Abb. 24), ursprünglich besiedelten Knorpelzellen hatte hier noch nicht stattgefunden. Nach 6-wöchiger in-vivo Verweildauer imponierten die vornehmlich zentral „leeren Areale“ schließlich teilweise bindegewebig durchsetzt. . Auch hier lässt sich kein spezieller Faktor oder stetes Muster feststellen, mit welchem sich die, mal mehr, mal weniger massive Bindegewebige Durchbauung nach 1- oder 6- Wochen erklären ließe.

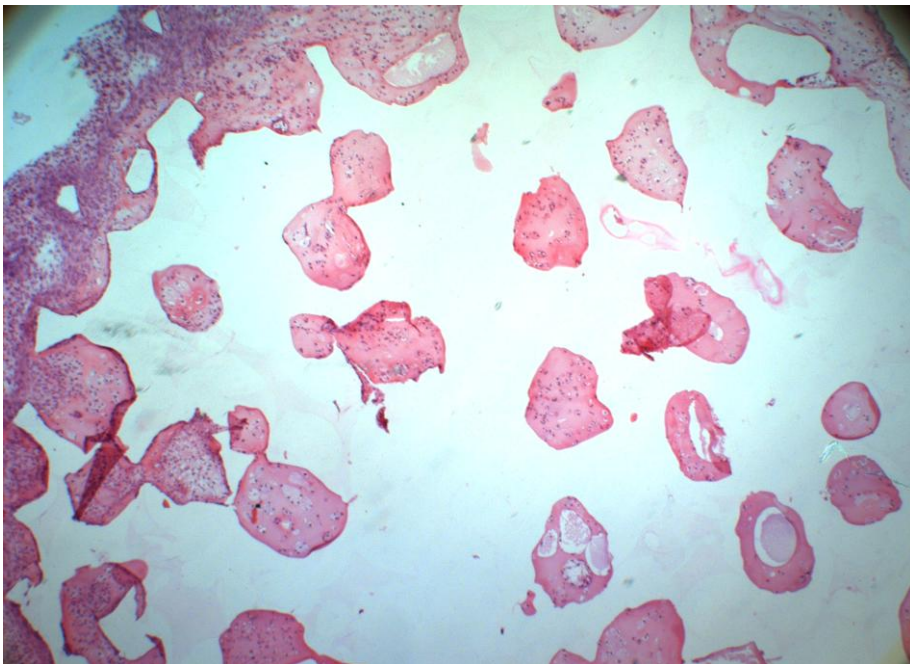
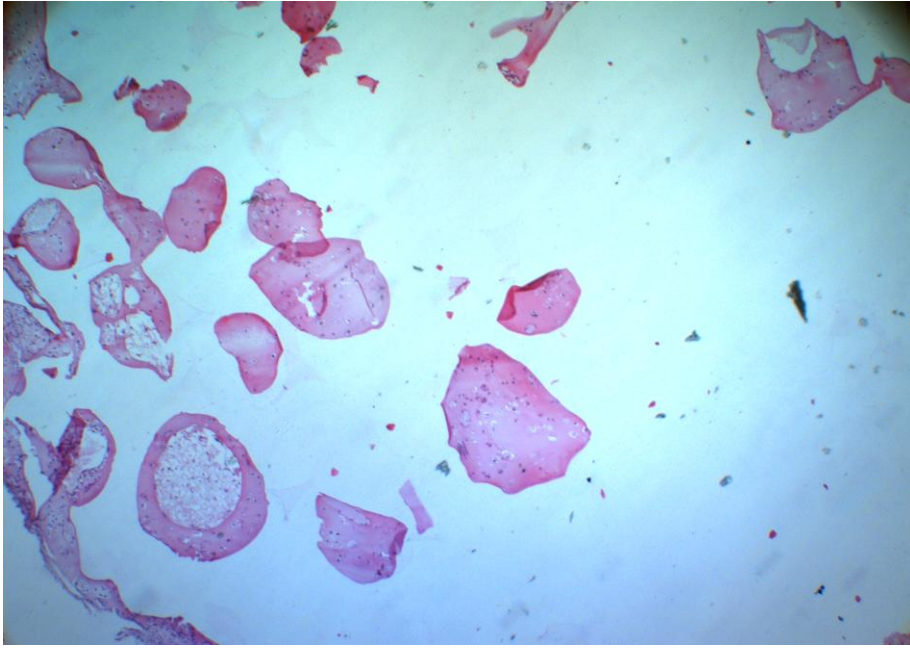


Abb. 23:

Oben: HE-gefärbter Schnitt aus der Mitte eines Kontrollskaffolds mit boviner Chondrozyten Besiedlung nach ein-wöchiger in-vivo Verweildauer: Knorpelige Besiedlung nur noch in vereinzelt Poren im Randbereich (neun Uhr im dargestellten Ausschnitt);

Unten: Oberflächliches Pendant zur oberen Abbildung: mit knorpeligen Anteilen befüllte Poren verteilt über die gesamte Schnittfläche.

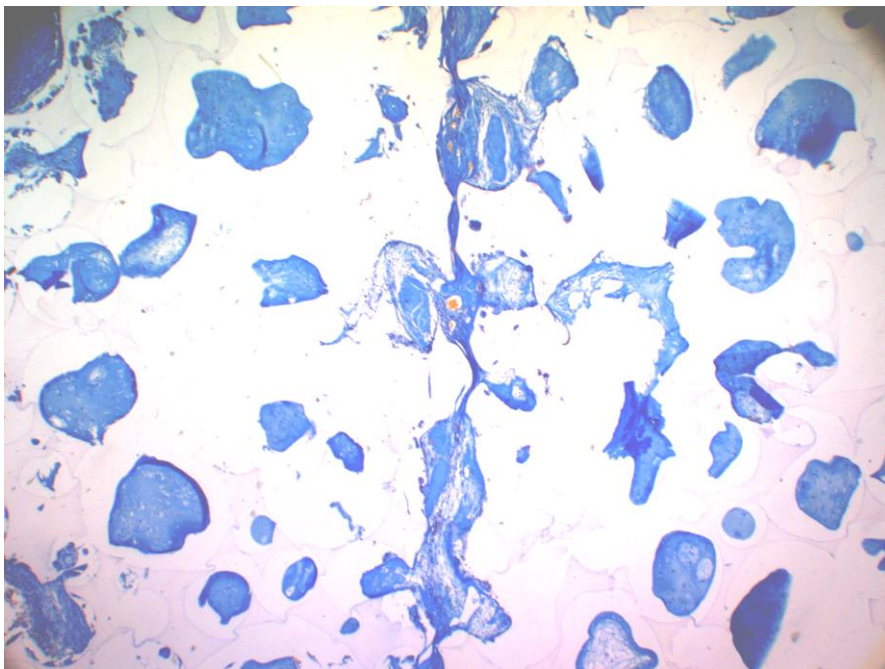
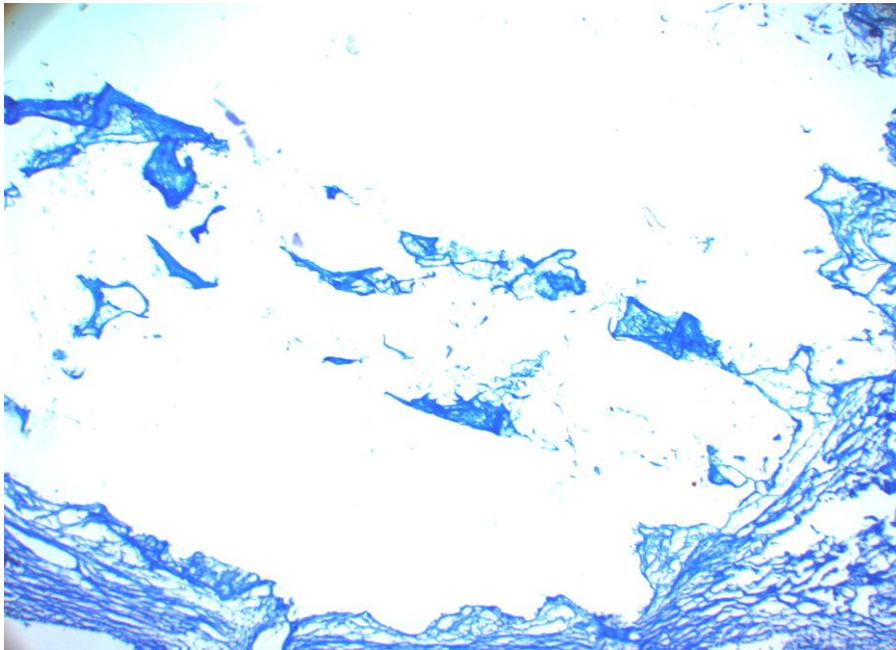


Abb. 24:

Oben: Azan-gefärbter oberflächlicher Schnitt eines Scaffolds implantiert am Hinterlauf und mit humanen Chondrozyten besiedelt. Explantation nach ein-wöchiger in-vivo Verweildauer: Knorpelige Anteile sind nicht mehr vorhanden. Bindegewebe zieht bandförmig, im Bereich des darunterliegenden Durchflussgefäßes quer über die Schnittfläche.

Unten: Mittiges Pendant zur oberen Abbildung: mit knorpeligen Anteilen befüllte Poren verteilt über die gesamte Schnittfläche. Bindegewebiges Band mit Anteilen des Durchflussgefäßes von 12 nach sechs Uhr ziehend; zu erkennen sind weiterhin Präparationsartefakte im Sinne von Rissen und Überlagerungen von Gewebeanteilen.

5.5. Statistische Auswertung

Statistische Auswertung von Versuch 1:

Quantitative Auswertung der primär unbesiedelt impiantierten Skaffolds bezüglich Einwachsen von Gewebe in-vivo :

- *Untersuchung der Durchfluss-Konfiguration sowie Ligatur Konfiguration in Abhängigkeit von Zeit:*

Mit prolongierter in situ-Zeit der Skaffolds nahm die Füllung von anfänglich vereinzelt Zellnestern bis hin zur kompletten Durchsetzung der Leitschienen mit Neogewebe nach 9 Wochen zu (Tab. 9 und 10). Dabei fiel in beiden Gruppen (Ligatur und Durchfluss) nach der 3.- und 4.- Woche ein Rückgang der Gewebefüllung auf.

Tab. 9:

Gewebefüllung aller ausgewerteten Schnitte in Abhängigkeit von Gefäßkonfiguration (Durchfluss versus Ligatur) und Zeit (1- 9 Wochen in-vivo - Verweildauer) ermittelt aus Tabelle 10. Die Angaben liegen in Prozent vor.

	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 9
Durchfluss-Gruppe	56	87	80	38	100
Ligatur-Gruppe	47	86	70	67	96

Tab. 10:

K/S: Kontrolle, bzw. Sample (Hinterlaufimplantat); Minimum/ Maximum: Anzahl der mit Gewebe gefüllten Sektoren im Implantat-querschnitt; Std. Abw.: Standard Abweichung; N: Anzahl der Untersuchten Präparate;

	K/S	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abw.	N
Woche 1	K	3.00	1	8	4.08	2.503	12
	S	4.00	2	8	4.25	2.006	12
	Total	3.50	1	8	4.17	2.220	24
Woche 2	K	7.50	4	9	6.75	1.865	12
	S	8.00	5	9	7.75	1.357	12
	Total	8.00	4	9	7.25	1.675	24
Woche 3	K	6.50	2	9	6.00	2.663	12
	S	7.00	3	9	6.33	1.923	12
	Total	7.00	2	9	6.17	2.278	24
Woche 4	K	9.00	8	9	8.85	.376	13
	S	6.00	2	9	6.00	1.758	12
	Total	8.00	2	9	7.48	1.896	25
Woche 9	K	9.00	8	9	8.67	.516	6
	S	9.00	8	9	8.67	.516	6
	Total	9.00	8	9	8.67	.492	12

Durchfluss-Konfiguration:

Während sich nach der ersten Woche kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Gewebefüllung im Vergleich von den Hinterlauf Implantaten mit den Kontrollen vom Rücken ergab ($p = 0,315$), zeigte sich nach der 2. Woche in den Hinterlauf-Implantaten eine signifikant höhere Sektorenfüllung ($p = 0,012$), als in den Nackenkontrollen: Nach der 2. Woche waren im Mittelwert 6 Sektoren in den Kontrollen, in den Schnitten der Hinterlauf-Implantate 7,83 Sektoren gefüllt (Tab. 11).

Tab. 11:

Quantitative Gewebefüllung aus der Gruppe mit Durchfluss-gefäß: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Anzahl Sektoren
K	6.00	4	9	6.00	1.477	12	
S	9.00	5	9	7.83	1.586	12	
Total	7.00	4	9	6.92	1.767	24	
Mann-Whitney U							29.000
Wilcoxon W							107.000
Asymp. Sig. (2-tailed)							.011
Exact Sig.							.012

Ligatur-Konfiguration:

In der Ligatur-Gruppe ergab sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied hinsichtlich Sektorenfüllung zwischen den Kontroll-Implantaten der Nackenregion und den Hinterlauf-Implantaten.

- Untersuchung der Implantatoberflächen versus Implantat-Mitte von Kontrollen und Hinterlaufimplantaten :

Kontroll-Implantate aus der Nackenregion

Die Auswertung der Kontrollen ergab eine signifikant höhere Sektorenfüllung ($p = 0.12$) an der Oberfläche der nicht isolierten Nacken-Implantate (Tab. 12). Während in der Mitte der Kontrollen die Sektorenfüllung im Mittelwert 5,71 betrug, präsentierte sich die Oberfläche im Mittelwert 7 gefüllten Sektoren

Tab. 12:

Gesamelte Daten ausgewerteter Kontrollimplantate hinsichtlich Gewebefüllung von Schnitten aus Implantatmitte versus Oberfläche; Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von einem bis neun Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Oberflächl./ Mittig	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Anzahl Sektoren
M	6.00	1	9	5.71	2.773	55	
O	8.00	1	9	7.00	2.264	56	
Total	7.00	1	9	6.36	2.600	111	
Mann-Whitney U							1120.500
Wilcoxon W							2660.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.012

Hinterlauf-Implantate

Die Auswertung der Hinterlauf-Implantate ergab eine signifikant höhere Sektorenfüllung ($p = 0.22$) in der Mitte der isolierten, gestielten Scaffolds (Tab. 13). Während die Sektorenfüllung an der Oberfläche der Hinterlauf-Scaffolds im Mittelwert 5,87 betrug, präsentierte sich die Mitte mit 6,95 gefüllten Sektoren (Mittelwert).

Tab. 13:

Gesamelte Daten ausgewerteter Hinterlaufimplantate hinsichtlich Gewebefüllung von Schnitten aus Implantatmitte versus Oberfläche; Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von einem bis neun Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Oberflächl./ Mittig	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Anzahl Sektoren
M	7.00	2	9	6.95	2.147	55	
O	7.00	1	9	5.87	2.495	55	
Total	7.00	1	9	6.41	2.378	110	
Mann-Whitney U							1137.000
Wilcoxon W							2677.000
Z							-2.289
Asymp. Sig. (2-tailed)							.022

Quantitative Auswertung der Gefäßanschnitte innerhalb der mit neuem Gewebe gefüllten Leitschienen: - Trendentwicklung in Abhängigkeit von In- vivo- Verweildauer“:

Bis zur dritten Woche post implantationem wird eine Zunahme der stichprobenartig ausgezählten Gefäßen in den mit Gewebe befüllten Sektoren (Durchfluss und Ligatur- Gruppe) verzeichnet. Nach Woche 4 und 9 zeigt sich, dass die Anzahl ausgezählter Gefäße im Vergleich zu Woche 3 im Mittelwert leicht abgenommen hat. Nach längerer in-vivo Verweildauer stagniert die Gefäßdichte quantitativ (Ligaturgruppe) und zeigt schließlich eine abnehmende Tendenz (Durchflussgruppe) (Tab. 14):

Tab. 14:

Daten der ausgewerteten Implantate hinsichtlich Anzahl stichprobenartig ausgezählter Gefäßanschnitte; Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Woche	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Deviation	N
1	1.00	0	24	4.68	7.265	44
2	14.00	3	32	14.81	7.301	48
3	16.00	1	36	16.35	7.085	48
4	14.00	1	43	16.12	9.966	49
9	14.50	5	24	15.00	4.611	28

- Untersuchung der Durchfluss-Konfiguration versus Ligatur Konfiguration

Vergleich der Hinterlauf-Implantate

Insgesamt unterscheiden sich die Implantate aus der Durchfluss-Skaffold tragenden Gruppe hinsichtlich Gefäßanzahl nicht signifikant von den Ligatur-Skaffold Trägern ($p = 0,386$) (Tab. 15).

Es wird eine durchschnittliche Füllung der Gewebe mit im Mittelwert 13,13 Gefäßen (Durchfluss-Gruppe) versus im Schnitt 13,85 Gefäßen (Ligatur-Gruppe) ermittelt.

Tab. 15:

Gesammelte Daten ausgewerteter Hinterlaufimplantate hinsichtlich Anzahl stichprobenartig ausgezählter Gefäßanschnitte der Durchfluss versus Ligatur- gruppe: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von einem bis neun Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Durchfluss/ Ligatur	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Anzahl Gefäße
D	12.50	0	43	13.13	8.537	112	
L	14.00	0	38	13.85	8.990	109	
Total	13.00	0	43	13.49	8.750	221	
Mann-Whitney U							5692.500
Wilcoxon W							12020.500
Z							-.867
Asymp. Sig. (2-tailed)							.386

- Untersuchung der Implantatoberflächen versus Implantat-Mitte

Kontrollen der Durchfluss- und Ligaturgruppen

Bei der isolierten Betrachtung der Kontrollen beider Gruppen (Durchfluss- und Ligatur) wird der Unterscheid der signifikant höheren Gefäßanzahl an der Implantat-Oberfläche im Vergleich zur Implantat Mitte deutlich; In den Kontrollen wurden im randständigen Schnitt: $15,59 \pm 8,93$ Gefäßlumina, im mittigen Schnitt: $11,09 \pm 7,15$ Gefäßlumina ausgezählt

Tab. 16:

Gesamelte Daten ausgewerteter Kontrollen Implantate hinsichtlich Anzahl stichprobenartig ausgezählter Gefäßanschnitte der Durchfluss und Ligatur- gruppe: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Oberflächl./ Mittig	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich	N	Anzahl Gefäße
M	11.00	0	31	11.09	7.147	55	
O	15.00	0	43	15.59	8.934	56	
Total	14.00	0	43	13.36	8.372	111	
Mann-Whitney U							1081.500
Wilcoxon W							2621.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.007

Hinterlauf Implantate

Reziprok zu den Kontrollen verhält es sich bei der isolierten Betrachtung der Hinterlauf-Implantate beider Gruppen (Durchfluss- und Ligatur). Im Vergleich zur Implantat-Oberfläche können in den Stichproben der Implantat Mitte signifikant mehr Gefäße ausgezählt werden ($p = 0,007$).

Tab. 17:

Daten ausgewerteter Hinterlauf-Implantate hinsichtlich Anzahl stichprobenartig ausgezählter oberflächlicher und Mittiger Gefäßanschnitte der Durchfluss und Ligatur- gruppe: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von einem bis neun Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Oberflächl./ Mittig	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Anzahl Gefäße
M	18.00	0	38	16.02	10.336	55	
O	11.00	0	27	11.22	7.109	55	
Total	13.00	0	38	13.62	9.153	110	
Mann-Whitney U							1062.500
Wilcoxon W							2602.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.007

Statistische Auswertung von Versuch 2:

Quantitative Auswertung der Knorpelgewebs-Persistenz innerhalb der, mit humanem, bzw. bovinem Knorpel besiedelten Leitschienen:

- *Untersuchung der Implantatoberflächen versus Implantat-Mitte:*

Besiedelte Kontrollimplantate

Bei den Kontrollen zeigt sich der Unterschied zwischen Oberfläche und Mitte im Hinblick auf Knorpelmenge als Höchst signifikant (Tab 18 und Abb. 25). Während im Mittelwert in 7,62 Sektoren der Oberfläche Knorpel festgestellt werden konnte, waren im Mittelwert mittig nur 5,33 Sektoren mit Knorpel gefüllt.

Tab. 18:

Daten ausgewerteter Kontroll-Implantate hinsichtlich Knorpelgewebepersistenz in oberflächlichen und Mittigen Präparatschnitten: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von einem bis neun Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Oberflächl./ Mittig	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
M	6.00	2	8	5.33	1.683	21	
O	8.00	5	9	7.62	1.465	21	
Total	6.50	2	9	6.48	1.941	42	
Mann-Whitney U							71.500
Wilcoxon W							302.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.000

Besiedelte und gestielte Implantate vom Hinterlauf

Bei den isolierten Implantaten am Hinterlauf (Woche 1 und 6) zeigte sich der Unterschied zwischen Oberfläche und Mitte im Hinblick auf Knorpelmenge als nicht signifikant ($p = 0,328$) (Tab. 19 und Abb. 25).

Tab. 19:

Daten ausgewerteter Hinterlauf-Implantate hinsichtlich Knorpelgewebspersistenz in oberflächlichen und Mittigen Präparatschnitten: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Oberflächl./ Mittig	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
M	8.00	5	9	7.73	1.241	22	
O	7.50	4	9	7.18	1.680	22	
Total	8.00	4	9	7.45	1.486	44	
Mann-Whitney U							201.500
Wilcoxon W							454.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.328

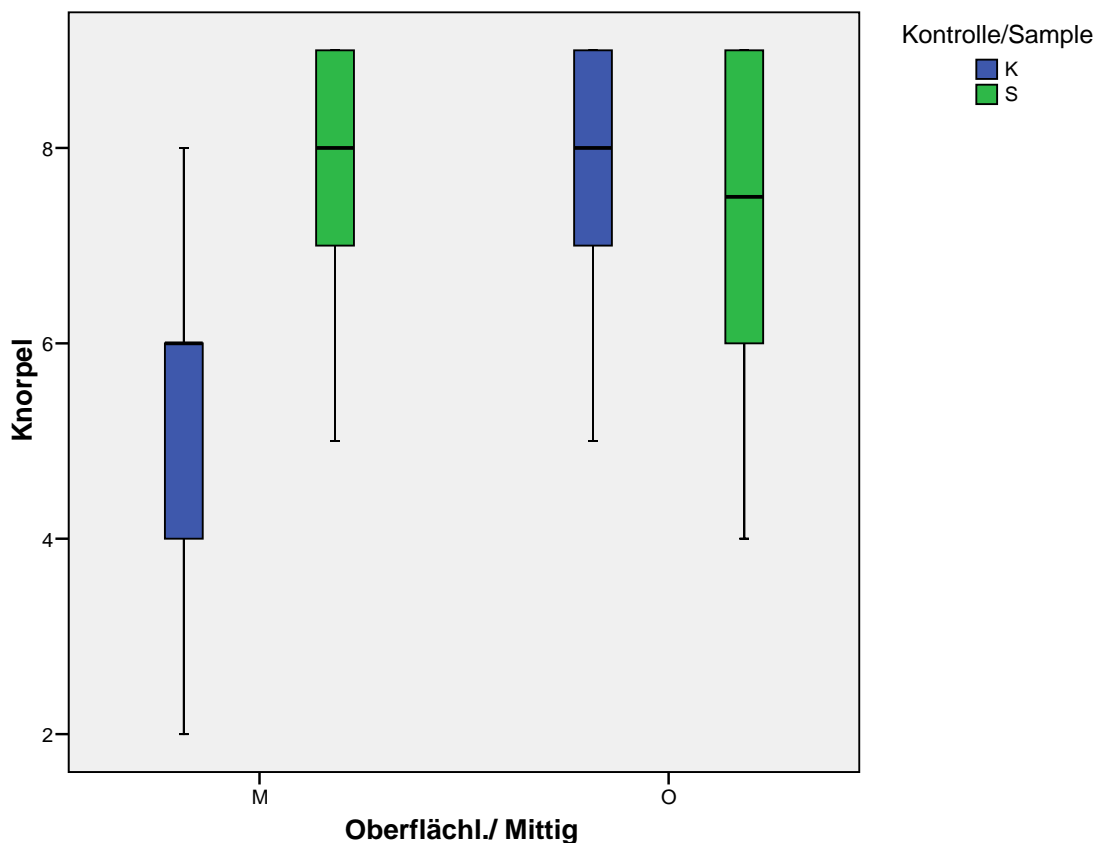


Abb. 25:

Boxplot-Diagramm zur Darstellung der Knorpelquantität in der Mitte und am Rand der besiedelten Kontroll- und Durchfluss-Implantate. Die Grafik ergibt sich aus den in Tabelle 18 und 19 gelisteten Werten. Dass in der Mitte der nicht isolierten Kontrollen die Knorpelgewebsdichte reduziert ist wird anschaulich. Im Vergleich dazu unterscheidet sich die Knorpelgewebequantität in den besiedelten Implantaten mit Durchflussgefäß (Sample) trotz Isolation sowohl randständig, wie mittig unwesentlich voneinander.

- Untersuchung der Kontroll- versus Hinterlaufimplantate beider Gruppen, d.h. bovin und humane Chondrozytenbesiedlung:

Bovine Chondrozytenbesiedlung:

In den besiedelten Implantaten vom Hinterlauf wurden signifikant mehr mit bovinen Chondrozyten besiedelte Sektoren gezählt als in den Kontrollen ($p = 0,014$) (Tab. 20): In den Kontrollen wurden oberflächlich und mittig im Mittelwert 6,23 besiedelte Sektoren gezählt, in den isolierten Implantaten der unteren Extremität hingegen 7,65.

Tab. 20:

Ausgezählte oberflächliche und mittige Gefäßanschnitte sämtlicher mit bovinen Chondrozyten besiedelte Implantate: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
K	6.00	2	9	6.23	2.069	22	
S	8.00	4	9	7.65	1.631	20	
Total	7.00	2	9	6.90	1.985	42	
Mann-Whitney U							124.500
Wilcoxon W							377.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.014

Humane Chondrozytenbesiedlung:

In den chondrozytär besiedelten Implantaten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den Hinterlauf- Implantaten ($p = 0,330$) (Tab. 21): In den Kontrollen wurden oberflächlich und mittig im Mittelwert 6,75 besiedelte Sektoren gezählt, in den isolierten Implantaten der unteren Extremität hingegen 7,29 Sektoren .

Tab. 21:

Ausgezählte oberflächliche und Mittige Gefäßanschnitte sämtlicher mit humanen Chondrozyten besiedelte Implantate: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
K	7.00	3	9	6.75	1.803	20	
S	7.50	4	9	7.29	1.367	24	
Total	7.00	3	9	7.05	1.584	44	
Mann-Whitney U							199.500
Wilcoxon W							409.500
Z							-.973
Asymp. Sig. (2-tailed)							.330

- *Untersuchung der Knorpelpersistenz bezüglich Abhängigkeit der „In-vivo-Verweildauer“ in Kontroll-Implantaten und Implantaten vom Hinterlauf (bovine und humane Chondrozytenbesiedlung):*

Bovine Chondrozytenbesiedlung:

Nach Woche 1 bestand ein schwach signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Implantat und Hinterlauf-Implantat hinsichtlich der mit Knorpelgewebe befüllten Sektoren ($p = 0,056$) (Tab. 22).

Tab. 22:

Ausgezählte oberflächliche und Mittige Gefäßanschnitte der mit bovinen Chondrozyten besiedelte Implantatenach 1 Woche in-vivo : Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
K	7.50	3	9	7.20	1.874	10	
S	9.00	4	9	8.30	1.636	10	
Total	9.00	3	9	7.75	1.803	20	
Mann-Whitney U							27.000
Wilcoxon W							82.000
Asymp. Sig. (2-tailed)							.056

Nach Woche 6 kann schließlich ein signifikanter Unterschied an Knorpelmenge zwischen Hinterlauf- und Kontrollimplantat verzeichnet werden ($p = .040$): Während in den Kontrollen im Mittelwert 5,42 Sektoren mit Knorpel gefüllt sind, sind es in den Leitschienen vom Hinterlauf 7 Sektoren (Tab. 23).

Tab. 23:

Ausgezählte oberflächliche und Mittige Gefäßanschnitte der mit bovinen Chondrozyten besiedelte Implantate nach 6 Wochen in-vivo : Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Media n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
K	6.00	2	8	5.42	1.929	12	
S	7.00	4	9	7.00	1.414	10	
Total	6.00	2	9	6.14	1.859	22	
Mann-Whitney U							29.500
Wilcoxon W							107.500
Asymp. Sig. (2-tailed)							.040

Gruppe mit humaner Chondrozytenbesiedlung:

Nach Woche 1 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Implantat vom Nacken und Hinterlauf-Implantat hinsichtlich der mit humanem Knorpelgewebe befüllten Sektoren ($p = 0,519$) (Tab. 24). Während in den Kontrollschnitten der Nackenimplantate im Mittelwert 6,33 Sektoren mit humanem Knorpelgewebe befüllt waren, waren es in den Hinterlauf Implantaten durchschnittlich 6,83 Sektoren.

Tab. 24:

Ausgezählte oberflächliche und Mittige Gefäßanschnitte der mit humanen Chondrozyten besiedelte Implantate nach 1 Woche in-vivo: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
K	6.50	3	9	6.33	1.875	12	
S	7.00	4	9	6.83	1.528	12	
Total	7.00	3	9	6.58	1.692	24	
Mann-Whitney U							61.000
Wilcoxon W							139.000
Z							-.646
Asymp. Sig. (2-tailed)							.519

Auch nach einer „In-vivo- Verweildauer“ von 6 Wochen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Implantat aus dem Nacken und Hinterlauf-Implantat bezüglich humaner Knorpelmenge ($p = 0.734$) (Tab. 25).

Tab. 25:

Ausgezählte oberflächliche und Mittige Gefäßanschnitte der mit humanen Chondrozyten besiedelte Implantate nach 6 Woche in-vivo: Minimum, bzw. Maximum bezieht sich auf die Füllung von 1 bis 9 Sektoren. Ermittelt wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte.

Kontrolle/Sample	Median	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweich.	N	Knorpel
K	7.50	5	9	7.38	1.598	8	
S	8.00	6	9	7.75	1.055	12	
Total	8.00	5	9	7.60	1.273	20	
Mann-Whitney U							43.000
Wilcoxon W							79.000
Z							-.399
Asymp. Sig. (2-tailed)							.690
ExactSig. [2*(1-tailed Sig.)]							.734

6. Diskussion

6.1. Allgemeine Problemdarstellung:

Die aktuelle rekonstruktiv chirurgische Standardtherapie für die Behandlung substantieller Gewebedefekte sieht den Einsatz autogener, allogener oder prothetischer Materialien, bzw. eine Kombination daraus vor. Autogene Transplantate sind jedoch begrenzter verfügbar, gehen nicht selten mit erheblicher Hebedefekt morbidity einher und weisen mitunter Mängel in puncto Materialqualität auf. Trotz diverser therapeutischer Ansätze existiert bis dato keine wertvolle Alternative. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich das Tissue Engineering mit der Herstellung zellulär besiedelter Konstrukte, die je nach individuellem Bedarf generiert werden.

Die Integration und das Überleben von subkutan eingepflanzten gezüchteten Knorpel-Biomaterial-Konstrukten sind längst nachgewiesen (Britt JC 1998). Britt et al. berichteten jedoch über die Schwierigkeit bei der Transplantation von gezüchteten Knorpelkonstrukten. Das Knorpelgewebe, welches nach einer Implantation in vivo erneut an eine andere Lokalisation transplantiert wurde, entwickelte Nekrosen aufgrund mangelnder Blutversorgung. Dies demonstrierte früh den vorrangig limitierenden Faktor, dass Tissue Engineertes Gewebe ab gewissen Dimensionen mangels initial fehlendem vaskulärem Anschluss untergeht, da eine Versorgung via Diffusion nur über geringe Strecken von wenigen Millimetern gewährleistet ist (Folkman J 1973). Lösungsansätze reichen vom Einsatz spezifischer Wachstumsfaktoren bis hin zur Generierung intrinsischer Gefäße, oder aber Verlagerung eines arteriovenösen Gefäßsystems zur Neuschaffung eines axial versorgten Gewebeareals, genannt Präfabrikation. Die Präfabrikation eines axial perfundierten Gewebelappens bietet die Möglichkeit eines defektgerechten, freien oder gestielten Lappens, ohne sich an vorgegebene, anatomische Perfusionsgebiete zu halten. Dieser Ansatz sieht die subkutane Implantation einer arteriovenösen Gefäßschlinge vor und gilt als etablierte Behandlungsstrategie in individuellen Fällen (Kloppel M 1997; Pribaz JJ 1999; Hoang NT 2009). Neben der axialen Lappenperfusion ist die Integration des Knorpelkonstruktes eine vielversprechende Option, die rekonstruktiven Möglichkeiten der Präfabrikation zu erweitern.

6.2. Hypothesenmodell und Ziel der Arbeit

Zahlreiche Klein- und Großtiermodelle sind etabliert; in der Literatur finden sich diverse Modelle an Ratte oder Kaninchen, bzw. Großtieren, in denen Tissue Engineering routiniert mit der Technik der Lappenpräfabrikation kombiniert wird (Nguyen TH 2005; Tanaka Y 2006; Arkudas A 2007; Lokmic Z 2007; Ren LL 2008). In der Maus scheitern bis dato mikrochirurgische Eingriffe an gegebenen Dimensionen (Durchmesser A. femoralis ca. 0,3 mm), wenn auch die Maus dank zahlreicher Charakteristika als Steckenpferd der medizinischen Forschung gilt. Ziel der vorliegenden Studie lag darin, ein einfach durchzuführendes, kostengünstiges und zeitlich akzeptables Modell zur Testung präfabrizierter Tissue Engineering Konstrukte in der Maus zu etablieren.

6.2.1. Präfabrikation

Die Präfabrikationstechnik wurde gewählt, um die Integration und das Überleben eingebrachter Tissue Engineerter Konstrukte im Anfangsstadium zu gewährleisten und bei Bedarf eine zukünftige Gewebeverlagerung zu ermöglichen.

Die gezielte Implantation der Konstrukte an Gefäßstiele (Tan BK 2004) soll im Zuge der natürlich einsetzenden Neovaskularisation ein lokales, intrinsisches Gefäßsystem schaffen (Hirase Y 1987). Gleichzeitig erhält die Leitschiene durch den Gefäßstiel die Option zur Verlagerung, vergleichbar mit einer freien Lappenplastik. Die Präfabrikation eines axial perfundierten Weichgewebelappens ermöglicht schließlich eine Defektdeckung, die nicht von anatomischen Perfusionsgebieten determiniert ist.

6.2.2. In vivo Verweildauer

In der Literatur variieren Angaben über das Zeitintervall, das der Prozess bis zur Ausbildung eines dichten Neovaskularisations-Netzes in Anspruch nimmt. Während Morrison et al (Morrison WA 1990) für die Hautlappen-Präfabrikation im Kaninchen von einem 8-12 wöchigen Zeit-Intervall ausgehen, berichten Cronin et al. (Cronin KJ 2004), bzw. Hirase et al. (Hirase Y 1987) von einer abgeschlossenen

Neovaskularisation einer implantierten Teflonkammer in der Maus, bzw. eines Muskellappens in der Ratte nach bereits 2 Wochen.

Andere Arbeitsgruppen (Itoh Y 1992; Takato T 1993) publizierten eine erfolgreiche dreiwöchige Präfabrikationsperiode, die wir mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten (Nguyen TH 2004; Staudenmaier R 2004; Hoang NT 2005; The Hoang N 2005) über Hautlappen Präfabrikation im Kaninchen bestätigen können.

In der vorliegenden Untersuchung wurde in einem Mausmodell zunächst ein unbesiedeltes Polyurethan-Skaffold um das femorale Gefäßbündel implantiert, um den zukünftigen Zellträger zu präfabrizieren. Die in-vivo - Verweildauer variierte von 1,2,3,4 und 6 Wochen, um den Zeitpunkt der maximalen Neogefäßdichte zu ermitteln;

Das hier vorgestellte murine Modell unterstützt nach statistischer Auswertung die These der dreiwöchigen Präfabrikationsperiode (Itoh Y 1992; Takato T 1993): die Auswertung ergab nach der dritten Woche eine maximale Gefäßdichte im unbesiedelten Konstrukt, die nach der vierten Woche wieder abgenommen hatte; dies kann dem Phänomen der Gefäß-Rarifizierung zugeschrieben werden und als wesentlicher Schritt im Prozess der physiologischen Gefäßneubildung gesehen werden kann (Post MJ 2002; Pandya NM 2006).

In einem Folgeversuch wurden mit humanen und bovinen Zellen besiedelte Konstrukte um das femorale Gefäßbündel implantiert und 1, bzw. 6 Wochen in vivo belassen. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnten besiedelte Tissue Engineerte Knorpelkonstrukte präfabriziert und dadurch ein freier Lappentransfer erfolgreich durchgeführt werden (Hoang NT 2009). Der Zeitraum, den die Autoren für die Präfabrikation der Konstrukte im Chinchilla Bastard-Rabbit Modell wählten betrug 6 Wochen. Experimente von Hickey verdeutlichten, dass nach einer Zeitspanne von 6 Wochen in der Mikroangiographie eine Perfusion des ganzen Weichteillappens über den axialen Gefäßstiel gegeben war, wobei dabei der Gefäßloop, bzw. das Konstrukt nicht isoliert wurde und eine Gefäßeinsprossung auch aus dem originären Gewebe stattgefunden hat (Hickey MJ 1998).

Analog dazu wurden die mit Chondrozyten besiedelten Konstrukte im zweiten Versuchsteil 6 Wochen in situ belassen: trotzdem sich sowohl nach 1, als auch nach 6 Wochen Unterschiede hinsichtlich Zell-Quantität zwischen den Skaffolds besiedelt

mit Chondrozyten bovinen- bzw. humanan Ursprungs zeigten, waren in beiden Gruppen nach diesem Zeitraum histologisch Chondrozyten nachweisbar.

Unklar bleibt, warum es vor allem in den mit humanen Chondrozyten besiedelten Scaffolds bereits nach 1 Woche in vivo Verweildauer zentral zum Zell-Untergang kam, welcher sich in zentraler Zell- und Matrix „Leere“ abseits des axialen Gefäßbündels zeigte; Miot et al. beobachteten in ihrer Untersuchung, in welcher Gelenkknorpel von Ziegen auf dreidimensional Poly(EthyleneGlycol)-Terephthalate/Poly(Butylene)-Terephthalate (PEGT/PBT) geschäumten, sphärischen Scaffolds (6mm Durchmesser, 1mm Dicke) kultiviert worden war ebenfalls ein ungleichmäßiges Verteilungsmuster (Miot S 2006): Gerade das Zentrum der dreidimensionalen Konstrukte zeigte sich unabhängig vom Kultivierungszeitraum ebenfalls „leer“. Schließlich bringen Miot et al. an, dass ihre Ergebnisse wieder verdeutlichen, dass Chondrozyten zwar einheitliche Reaktionsmuster besitzen, diese jedoch Spezies-abhängige Besonderheiten aufweisen (Malda J 2005; Miot S 2005): Giannoni et al untersuchten, inwieweit das De-Differenzierungsmaß zwischen verschiedenen Spezies variiert und verglichen dabei Gelenkknorpelzellen von Schaf, Hund und Mensch. Hierbei konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass humane Chondrozyten während der Zellkultur signifikant stärker zu Dedifferenzierung neigen als Chondrozyten vom Schaf oder Hund. Andere Arbeitsgruppen wie die von Ting V. et al berichten ebenfalls über Schwierigkeiten mit Knorpelzell-Kulturen humanen Ursprungs (Giannoni P 2005): In ihrer Arbeit über in vitro Knorpel-Tissue Engineering mit Zellen humanen Ursprungs und Fibrin-Kleber verblieben am Ende von 4 Wochen nur 12% der Konstrukt-Ausgangsgröße wobei die Entwicklung von knorpelartigem Gewebe nur in sehr reduziertem Umfang nachgewiesen wurde: die Zellen blieben bis zum Konstruktzerfall vital, produzierten jedoch minimal ECM (Ting V 1998).

Diese Beobachtungen und Aussagen bestätigen schließlich, dass der direkte Vergleich von Ergebnissen aus einem identischen Versuchsaufbau trotz Verwendung von Zellen unterschiedlicher Spezies kritisch zu betrachten ist und vor allem noch weitere Untersuchungen bezüglich Herstellung dreidimensionaler Tissue Engineering Konstrukten besiedelt mit humanen Chondrozyten notwendig sind.

6.2.3. Das Mausmodell

Der Einsatz lebender Tiere fordert ethische Verantwortung, d.h. in-vivo-Versuche müssen mit Bedacht geplant und durchgeführt werden (Zamir T 2006): Vor jedem Tierversuch muss abgewogen werden, welche Tierart, beziehungsweise welcher Stamm und vor allem welches Modell für die jeweilige Fragestellung in Betracht kommt (Forni M 2007). In der Zell- und Organtransplantations- Forschung, wie auch dem Tissue Engineering werden für präklinische Untersuchungen vielfach athymen Nacktmäuse oder -ratten als Versuchstiere eingesetzt.

Für die Lappenpräfabrikation arbeiten Wissenschaftler meist zunächst mit Ratten oder Kaninchen. Denn in der Maus scheitern mikrochirurgische Eingriffe an gegebenen Dimensionen (Durchmesser A. femoralis ca. 0,3 mm). Generell gilt die Maus jedoch dank zahlreicher Charakteristika als Steckenpferd der medizinischen Forschung - dazu zählen die genetische Ähnlichkeit zum Menschen - 80% DNA sind in Mensch und Maus identisch (Waterston RH 2002), die Verfügbarkeit zahlreicher transgener- und knock-out Stämme (Manis JP 2007), sowie muriner Antikörper, eine kurze Lebensspanne und Reproduktionszyklus, der verträgliche Charakter, die Größe, eine kostengünstige Haltung und die sich daraus ergebende Möglichkeit zur großen Gruppenstärke.

In der Literatur finden sich diverse Modelle an Ratte oder Kaninchen, bzw. Großtieren, in denen Tissue Engineering routiniert mit der Technik der Lappenpräfabrikation kombiniert wird (Nguyen TH 2005; Tanaka Y 2006; Arkudas A 2007; Lokmic Z 2007; Ren LL 2008). Bis dato findet sich in der Literatur nur eine vergleichbare Arbeit am Mausmodell von Cronin et al. (Cronin KJ 2004), in der ein Maus- Modell zur Lappen-Präfabrikation beschrieben wird: die Arbeitsgruppe verwendete dafür rigide, dicht verschlossene Silikon-, sowie Polykarbonat-Kammern in Zylinderform, die mit Matrigel oder Polylactid-Co-Glycolic Acid (PLGA) befüllt wurden. In subkutaner Lage üben rigide Implantate jedoch einen starken mechanischen Reiz aus, der längerfristig gesehen die darüber liegende Haut zu perforieren droht. In bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit einer flexiblen Umhüllung aus Silikonfolie konnte dem Anspruch an eine großflächige Isolation gegen umliegendes Gewebe ausreichend gerecht werden. Des Weiteren wurde in unserem Modell im Gegensatz zur Arbeit von Cronin et al. kein Wert auf

eine komplette Isolation der Leitschiene gelegt. Die Folie blieb an Gefäßein- und Austrittsstellen der Matrix ausgespart, da selbst eine maximale Isolation nicht verhindern könnte, dass Zellen systemischen Ursprungs transmural, bzw. aus der Umgebung durch aktive Migration entlang der Gefäßachse in die Matrix eintreten (Pandya NM 2006).

Aufgrund der Größenverhältnisse und der Tatsache, dass in unserem Versuchsaufbau Zellen humanen und bovinen Ursprungs transplantiert werden sollten, fiel die Wahl auf folgende Stämme: Für den ersten Versuchsteil wurden NMRI- Mäuse verwendet; dieser Stamm gilt wegen der wertvollen Widerstandsfähigkeit der Tiere, ihrer kostengünstigen Anschaffung und der geringeren Spezifität des Genotyps als eines der Steckenpferde unter den Auszuchtstämmen für sämtliche experimentelle Anforderungen (technische Pilotprojekte, toxykologische- und pharmakologische Tests). Im Fall dieser Untersuchung bewährten sich die Tiere unter anderem aufgrund ihrer verhältnismäßig ausgeprägten Körpergröße, die die Eingriffe am Gefäßsystem praktisch erleichterten. In der experimentellen Planung zu berücksichtigen ist zudem stets die Lebenserwartung der Tiere; aus der Literatur ist die Anfälligkeit älterer Tiere gegenüber einer Vielzahl neoplastischer Erkrankungen bekannt Da sich die längste Überlebensanforderung dieses Experimentes jedoch auf 6 Wochen belief und die Tiere nach abgeschlossenem Wachstum, d.h. mit ca. 7 Wochen in den Versuch integriert wurden war davon auszugehen, dass während des gesamten Versuchs das Risiko systemischer Erkrankungen äußerst gering geschätzt werden konnte (Bomhard E 1989). Für den zweiten Versuchsteil fiel die Wahl angesichts der bevorstehenden Xenotransplante (humane und bovine Chondrozyten besiedelt Tissue Engineering Implantate) auf den entsprechenden immuninkompetenten Stamm mit großflächiger Lymphozyten-Armut, vor allem der T- Zellen (nu/nu). Problematisch für die Verwendung dieses Stammes ist die bei reduziertem Immunstatus eingeschränkte Lebenserwartung der Tiere. Durch eine weitreichende Abschirmung der Tiere konnte gezeigt werden, dass die zu erwartende Lebensspanne unter konventionellen Haltungsbedingungen auf das gleiche Maß der immunkompetenten Artgenossen gesteigert werden kann.

Dass die Wahl der Tiere bezüglich Studienziel gut getroffen wurde, bestätigt sich in dieser Untersuchung durch den angenehmen und unkomplizierten Umgang, die geringe Ausfallquote (0,6%, d.h. 2 unklare anästhesiologische letale Zwischenfälle) und die chirurgisch erfolgreich zu bewerkstelligenden technischen Anforderungen.

6.2.4. Zwei vaskuläre Konfigurationen: Durchfluss versus Ligatur als Loop-Äquivalent

In der Maus ist die Gefäßsituation zu klein ist, um einen mikrovaskulären Loop anzulegen. So wurden in dieser Untersuchung im Rahmen eines ersten Versuchs stellvertretend zwei vaskuläre Konfigurationen verwendet (Ligatur -, sowie ein Durchfluss-Gefäßstiel), deren angiogenetisches Potential aus früheren Arbeiten bekannt ist (Khoury RK 1993; Tanaka Y 2003): In der hier beschriebenen Untersuchung wurden in einem Mausmodell zunächst unbesiedelte Polyurethan-Scaffolds um ein arteriovenöses Bündel implantiert, um den zukünftigen Zellträger zu präfabrizieren. Das Bündel wurde zum einen als Durchfluss-System belassen, zum anderen nach Verlassen des Implantates ligiert.

Dass kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Konfigurationen (ligiertes versus Durchfluss- Gefäßbündel) hinsichtlich Neo-Gewebe-generation besteht konnte in einer Arbeit von Tanaka et al. gezeigt werden, indem das Volumen neu generierten Gewebes um die Gefäßstiele zwischen zwei Blättern artifizieller Dermis verglichen wurde. Ergebnisse aus der von uns beschriebenen Untersuchung decken sich mit dieser Feststellung; die Gewebequantität unterschied sich in der Ligatur-Gruppe nicht wesentlich von der Durchfluss-Konfiguration: der direkte Vergleich der beiden Gruppen erbrachte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Gewebefüllung der Leitschienen ($p = 0,465$); in der Durchflussgruppe waren im Mittelwert 6,23 von 9 Sektoren mit Gewebe gefüllt, in der Ligaturgruppe waren es 6,54 Sektoren. Ebenso wenig signifikant unterschieden sich die Implantate aus der Durchfluss-Gruppe hinsichtlich Gefäßanzahl von den Ligatur-Gruppe ($p = 0,386$). Trotzdem fanden sich in der Durchflussgruppe innerhalb des Neogewebes im Mittelwert 13,13 Gefäße; d.h. weniger als in der Ligatur-Gruppe mit 13,85 Gefäßen. Auch dieses Phänomen wird von der Gruppe um Tanaka beschrieben, wenn auch auf eine quantitative Auswertung der Neoangiogenese verzichtet wurde. Die Autoren

merken an, dass oszillierende Bewegungen des Blutes bedingt durch die Ligatur in diesem Fall als wesentlicher angiogenetischer Trigger fungieren würden. Dies setzt jedoch die Durchgängigkeit des ligierten Gefäßstieles voraus, welche in unseren Untersuchungen nicht immer gegeben war. Das oben genannte Ergebnis in puncto Gefäß-Quantität in unseren Untersuchungen trotz einer 24 %igen (4 von 17 ligierten Stielen) Thromboserate gegeben war, könnte evtl. darauf zurück zu führen sein, dass auch andere Faktoren, wie Blutung, Chirurgisches Trauma, Entzündung sowie Koagulation nachgewiesenermaßen angiogenetische Prozessen maßgeblich unterstützen (Rhodin JA 1989).

Eine andere Arbeitsgruppe um Cronin et al. berichtet bei vergleichbarem Versuchsaufbau von einer ähnlich hohen Thromboserate von 25 % in der Ligatur-Gruppe (Cronin KJ 2004) im ersten Versuchsschritt. Auch hier veranlasste diese Beobachtung die Untersucher im zweiten Versuchsschritt auf den Einsatz ligierter Gefäßbündel zu verzichten. In der Ligatur-Gruppe erfolgte bei Cronin et al. der Gefäßverschluss auf Popliteal-Höhe, das femorale Gefäßbündel wurde daraufhin vollständig proximalwärts bis zum Abgang der Arteria femoralis disseziert und in die Kammer gelegt. Zwischen Abzweigung aus dem femoralen Gefäßbündel und Eintritt in das inguinale Fettdepot verlaufen in der Maus Arteria und Vena epigastrica superficialis über eine Distanz einiger Millimeter frei flottierend; Cronin et al verwendeten diese anatomische Gegebenheit als axiales Durchfluss-Gefäßbündel, in dem sie die Kammer am frei flottierenden Gefäßabschnitt vor das Fettdepot implantierten. Im menschlichen Körper ist eine derartige Gefäßanatomie nicht gegeben, weshalb in dieser Studie das Durchflussmodell ebenfalls am femoralen Gefäßbündel designed wurde. Eine distalere Skaffold-Lage bietet im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen bezüglich Verlagerung des implantierten Konstruktes (im Sinne gestielter Lappenplastiken) unserer Meinung nach den Vorteil eines vergrößerter Radius, der Mobilität und Reichweite des Gefäßstils vergrößert.

6.2.5. Gewebeentwicklung

6.2.5.1. Entzündungsreaktion

Sämtliche Explantate im ersten Versuch zeigten bis zu einer in vivo Verweildauer von 2 Wochen mikroskopisch andeutungsweise inflammatorische Veränderungen auf das

Biomaterial oder die Zell-Biomaterial-Konstrukte: mikroskopisch detektiert wurden Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten. Diese Beobachtung deckt sich mit der anderer Arbeitsgruppen die beschreiben konnten, dass jede Fremdmaterial- Implantation in einer kurzzeitigen akuten Entzündungsreaktion resultiert (Kraft CN 2000; Laschke MW 2005). Rucker et al. untersuchten die angiogenetische und inflammatorische Gewebereaktion nach Implantation von Poly-L-Lactid-Co-Glycolid (PLGA) und Kollagen–Chitosan–Hydroxyapatite Hydrogel Scaffolds in Rückenkammern von Mäusen (Rucker M 2006) . Im Gegensatz zur immunologisch adäquaten Implantationsreaktion auf PLGA (initial moderate Entzündungsreaktion und schließlich angiogenetische Induktion) dokumentierte die Arbeitsgruppe eine durchgehend massiv lokale schwere Entzündungsreaktion auf die Hydrogel- Implantate sowie Ausbleiben jeglicher Mikrogefäß- Induktion und begründet die erfolglose Hydrogel Implantation mit einer toxischen Materialzusammensetzung. Trotzdem im ersten Versuchsdurchgang des hier beschriebenen Experimentes ähnlich massive Entzündungsreaktionen verzeichnet wurden, führen wir dies nicht auf Material-Spezifität zurück: In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2002 widerlegte die Arbeitsgruppe um Roumen- Klappe das bis dato gängige Postulat, dass der low-grade Infekt als Ausgangs- Risikofaktor der tiefen Beinvenenthrombose bezeichnet wird (Roumen-Klappe EM 2002) Roumen et al. konnten mittels quantitativer Analyse von Entzündungsmediatoren belegen, dass sich der Kausalzusammenhang genau gegensätzlich verhält und die akute Thrombose als Auslöser der Entzündungsantwort zu werten ist. Diesbezüglich gehen wir in unserem Experiment davon aus, dass die massive Entzündungsreaktion, die in den Explantaten mit ligierter Gefäßkonfiguration zu beobachten war als Folge des thrombotischen Geschehens im dafür prädisponierten endständig ligierten Gefäßstiel zu werten ist. In der Tat zeigten die zytomorphologischen Strukturen, die sich innerhalb der gestielten Implantate fanden im Hinblick auf einwachsendes Granulationsgewebe sowie Neo-Autoformation Ähnlichkeit zur Thrombus-Organisation (Feigl W 1985): vereinzelte Monozyten, z.T. in Kontakt mit Thrombozyten und zahlreichen Fibrinfasern deuten auf die Aktivierung des mononukleären Makrophagensystems hin.

Untermuert wird diese Behauptung durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit in der die in diesem Versuch verwendeten Polyurethan Konstrukte in vitro auf potentiell

geno- und zytotoxische Effekte in Chondrozyten getestet wurden (Havla JB). Die Auswertung ergab, dass bei der Implantation von Polyurethan in der hier verwendeten konzentrierten Zusammensetzung keine zyto- oder genotoxischen Reaktionen zu erwarten sind.

6.2.5.2. Spontane Adipogese im unbesiedelten Implantat

Die Untersuchung der subkutan implantierten, unbesiedelten Kontroll- Scaffolds aus dem ersten Versuch erbrachte folgenden unerwarteten Trend: Während die Präparate nach einer Woche in vivo Verweildauer vorwiegend klares Sekret und vereinzelt Entzündungszellen (siehe 6.2.2.) am Übergang zur Matrix aufwiesen, war nach prolongierter in vivo Verweildauer ein zunehmende Porenfüllung mit Fettgewebe erkennbar. 2008 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Thomas Ergebnisse ihrer Untersuchung bezüglich adipogenetischem Potential der Inflammation im in vivo Experiment Zymosan-induced inflammation stimulates neo-adipogenesis (Thomas GP 2008);

Die Wissenschaftler hatten 2 Silikonkammern mit axialem Durchflussgefäß (A. epigastrica superficialis) und Matrigelfüllung in beide Leisten C57Bl6 Mäuse implantiert und stets in einer der beiden Kammern mittels Zymosan- Applikation eine Entzündungsreaktion getriggert. Die Auswertung zeigte schließlich in beiden Kammern eine indirekte low-grade Infekt getriggerte Adipogese. Betrachtet man die oben beschriebene low-grade Infekt bestimmte Fremdkörperreaktion auf die von uns verwendeten PU- Scaffolds als vergleichbaren Trigger wäre die Füllung der unbesiedelten Kontroll- Implantate am Nacken auf den gleichen Mechanismus zurückzuführen:

Die Wissenschaftler um Thomas et al postulieren die Mobilisierung zirkulierender Populationen von Präadipozyten, die spezielle Chemokin-Rezeptoren ausbilden sowie entlang des Infekt- bedingten Chemokin- Gradienten in die Kammern wandern würden (Hong KM 2005). Welcher Faktor, sei es Silikon- Isolation oder das axiale Gefäßbündel schließlich für das Ausbleiben der Adipogenese in den unbesiedelten Konstrukten am Hinterlauf verantwortlich ist, ist noch unklar. Die 2007 von Thomas et al. veröffentlichten neuen Erkenntnisse wurden lediglich bezüglich Adipositas-

Entstehung diskutiert; weiterführende Untersuchungen im Bezug auf Fett- Tissue Engineering sind diesbezüglich bis dato in der Literatur nicht zu finden, stellen allerdings angesichts des vielversprechenden Potentials für die Rekonstruktive Chirurgie eine interessante Grundlage für die zukünftige Forschung dar.

6.2.5.3. Knorpelgenerierung trotz Isolation

Ein wichtiges Ergebnis des ersten Versuchs und Basis für das Procedere im Rahmen des zweiten Versuchs ist, dass in keiner der Kontrollen, bzw. unbesiedelten Hinterlaufimplantaten Chondrozyten verifiziert wurden; demnach ist davon auszugehen, dass es sich bei dem detektierten Knorpel tatsächlich um das initial eingebrachte Knorpelgewebe handelt.

Bei einigen tissue engineerten Knorpel- Konstrukten zeigte sich nach Explantation eine geringgradige Deformierung in Form einer Kantenabrundung. Ursächlich hierfür könnte eine grenzwertige Durchblutung in der Initialphase nach der Implantation sein. Die Konstrukte sind bis auf Ein- und Austrittsstellen des Gefäßbündels mit Silikonfolie bedeckt, wohingegen die gesamte Oberfläche der Kontrollen Möglichkeit zum Diffusionsaustausch bildet. Die größtenteils erfolgreiche Persistenz der Chondrozyten im Konstrukt war makroskopisch sichtbar und konnte histologisch dokumentiert werden.

Neokartilaginäres Gewebe innerhalb der besiedelten Konstrukte im zweiten Versuchsdurchgang zeigte sich makroskopisch homogen. Mikroskopisch wurde die konstante Durchgängigkeit der Poren nach den Präfabrikationszeiträumen von einer und sechs Wochen widerlegt, wobei hier vor allem die mit humanen Chondrozyten besiedelten Konstrukte betroffen waren. Diese Beobachtung wurde auch in vorausgehenden Untersuchungen an implantierten Knorpelkonstrukten im Chinchilla-Bastard Präfabrikationsmodell nach einer Verweildauer von 8 Wochen in-vivo gemacht (Hoang NT 2009).

Insgesamt sollte es Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben, die Ursache mangelnder homogener Knorpelbesiedelung im Konstrukt zu finden, wobei es gilt diverse Ursachen auszuschließen: Material-, bzw. Struktur- spezifische Mängel, Zellqualität, Konstrukt- Befüllung, etc.. Dass das Grundkonzept dieses

Versuchsaufbaus erfolgversprechend ist zeigt schließlich die statistische Auswertung, die aufzeigt, dass die besiedelten, gefäßgestielten Konstrukte am Hinterlauf trotz Isolation entweder nicht signifikant weniger Knorpelmenge (humane Chondrozyten), bzw. sogar signifikant mehr Knorpelmenge beinhalteten.

6.2.5.4. Gewebegeneration innerhalb des Implantates: Zentral versus Peripher

Gerade die Ergebnisse der statistischen Auswertung, welche die Unterschiede zwischen Implantatmitte und Oberfläche im Hinblick auf Gewebe,- bzw. Gefäßquantität aufzeigt bestätigt das Konzept der Präfabrikation: im direkten Vergleich zeigten sich die unbesiedelten Kontroll-Implantat-Oberflächen signifikant mehr befüllt, als ihr mittiger Anteil. Analog dazu enthielten die oberflächlichen Schnitte eine signifikant höhere Gefäßanzahl im Vergleich zur Implantatmitte. Dieses Ergebnis ist sicherlich auf die limitierte Gewebeversorgung via Diffusion zurückzuführen, welche von den Verfechtern der Präfabrikation im Tissue Engineering viel zitiert wird (Beier JP 2009): Nur die offenporige Oberfläche der Kontroll- Implantate wird aus der unmittelbaren Umgebung via Diffusion mitversorgt. Trotz der kleinen Dimensionen der verwendeten Implantate ist ein Unterschied im Zentrum der Scaffolds bereits nachweisbar und macht die Notwendigkeit einer Lösung der nicht vorhandenen Gefäßanbindung deutlich.

6.3. Ausblick und Perspektive:

6.3.1. Alternative Biomaterialien

Die zytomorphologischen Strukturen, die sich innerhalb der gestielten Implantate fanden zeigten im Hinblick auf einwachsendes Granulationsgewebe sowie Neo-Autoformation mehr oder weniger ausgeprägte Ähnlichkeit zur Thrombus-Organisation (Feigl W 1985): vereinzelte Monozyten, z.T. in Kontakt mit Thrombozyten und zahlreichen Fibrinfasern deuten auf die Aktivierung des mononukleären Makrophagensystems hin. Die adipozytäre Durchsetzung der Kontrollen wurde in der Literatur bereits diskutiert: Thomas et al. konnten zeigen,

dass ein chronischer Status geringgradiger Entzündung, wie er mit der Implantation von jeglichem Fremdmaterial einhergeht, die Adipogenese begünstigt (Thomas GP 2008). Inwieweit ein implantierter Gefäßstiel adipogenetische Prozesse im selben Organismus unterbindet, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Schließlich bleibt anzumerken, dass sich in keiner der implantierten Nackenkontrollen Zeichen einer Knorpel-Neoformation zeigte, was entsprechend vorausgehender Untersuchungen zu erwarten war (Nguyen TH 2004; Hoang NT 2005; Hoang NT 2005).

Trotzdem hat dieses Experiment erneut gezeigt, dass es gilt, den Grad der reaktiven Infektion unabhängig der Ursache zu limitieren, was die Herstellung von geeigneten Scaffolds zur Schlüsselrolle im Tissue Engineering deutlich macht: es gilt eine Matrix zu stellen, welche Organogenese innerhalb einer biomimetischen Struktur ermöglicht und physikalische Protektion bietet (Wong VW).

Schwierigkeiten die sich aus der Verwendung statischer nichtresorbierbarer Formen mit Platzhalterfunktion ergeben kristallisieren sich unter anderem in der Arbeit von Neumeister et al heraus, wo eine Silikonplatzhalter in Ohrmuschelform im Rattenmodell in subkutan präparierte Bauchtaschen auf das proximal gestilte, mobilisierte femorale Gefäß-Nervenbündel in Präfabrikationsmanier implantiert wurde. Der Platzhalter wurde nach 14 Tagen mit einem Chondrozyten-Fibrin Gemisch ersetzt (Neumeister MW 2006). In der Diskussion vermerken die Autoren die Schwierigkeiten bezüglich Formstabilität der präfabrizierten Kapsel nach Entfernung des Silikon- Spacers sowie assoziiertem lokalem Hautuntergang durch das nichtresorbierbare Fremdmaterial.

Demgegenüber wurden und werden natürliche Materialien autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs als Leitschienen verwendet und mit Zellen und/ oder Wachstumsfaktoren beladen. In Anbetracht der Ressourcen-Knappheit, Hebedefekt-Morbidität, Limitation bezüglich Strukturform etc., popularisierte sich der Gebrauch synthetischer Biomaterialien z.B. in Form von Polymeren oder Hydrogelen. Gerade in Verbindung mit dem technischen Fortschritt auf dem Gebiet der Microfabrikation, dem Mikroprinting, dem Computer Modeling und ähnlicher Nanotechnologie werden Leitschienen nicht mehr nur als passive Strukturen produziert, sondern übernehmen mehr und mehr die Rolle als aktive Leitschienen, welche Zell- Matrix Interaktionen modulieren.

6.3.2. Die Kombination von Tissue Engineering und Lappenpräfabrikation im klinischen Alltag

Präfabrizierte Tissue Engineerte Knorpelkonstrukte bieten als „custom-made flap“ die Möglichkeit der defektgetreuen Formgebung z.B. bei der posttraumatischen oder congenitalen Ohrmuscheldefekt-Situation. Individuell Tissue- Engineerte Konstrukte lassen sich weitestgehend unabhängig von anatomischen Gegebenheiten konditionieren. Für diese Anwendung in Präfabrikations-Manier in Plastisch-Rekonstruktivchirurgischem Rahmen sind diverse Gefäßstiele verfügbar: Im Kopfbereich wäre z.B. ein Gefäß-Loop aus Arteria und Vena temporalis superficialis mit finaler regionaler Transposition denkbar. Eine Gefäßschlinge z.B. der Arteria circumflexa femoralis lateralis oder Arteria radialis hingegen wäre durchaus für eine Präfabrikation von freien-, oder aber gestielten Tissue- Engineerten Konstrukten größerer Dimensionen geeignet (Pribaz JJ 2001).

Nicht zu vergessen die etablierte Technik der Gefäß-Interposition, für welche häufig Abschnitte aus dem oberflächlichen Venensystem der unteren Extremitäten verwendet werden und mit welcher sich an sämtliche Perforatoren eine Gefäßschleife anschließen ließe. Der Benefit des additiven Einsatzes von Hautexpandern wird nach wie vor kontrovers diskutiert, könnte aber das spannungsfreiere Einbringen eines größer dimensionierten Konstruktes gewährleisten, bzw. den Verschluss des Hebedefektes erleichtern (Khoury RK 1991).

Dass diesen eben genannten Aspekten zahlreiche weitere Experimente zur Klärung diverser Aspekte essentiell sind ist offensichtlich.

Sollten in letzter Instanz schließlich Tissue Engineerte Konstrukte im Großtiermodelle gelingen wäre z.B. die klinische Etablierung der Ohrmuschelrekonstruktionen gebahnt.

Sterodimas et al fassten den status quo der wissenschaftlichen Situation der Ohrmuschel- Rekonstruktion mittels Tissue Engineering kürzlich folgendermaßen zusammen: obwohl in der Literatur bereits über die erfolgreiche Herstellung von Neo-Knorpel in vorgegebener Form und dreidimensionaler Struktur vor allem in immuninkompetenten Tierversuchen berichtet wurde, scheitern die meisten Konzepte im immunkompetenten Versuchsmodell; d.h. perfektes Material und Methode, welche die einzigartige komplexe Struktur einer Ohrmuschel vor allem dauerhaft verlässlich

ersetzt sind noch nicht gefunden, bzw. deren langfristige Dauer in vivo noch nicht getestet. Trotzdem verspricht der aktuelle Stand der Wissenschaft eine klinische Anwendung Tissue- Engineerter Knorpelkonstrukte in naher Zukunft; dies sollte der Fall sein, sobald die letzten Hindernisse mittels weiterer Experimente z.B. an Modellen wie dem hier vorgestellten überwunden werden konnten (Sterodimas A 2009).

6.3.3. Chirurgische Handhabung präfabrizierter Tissue Engineerter Konstrukte

Die im nachfolgenden beschriebenen Details, die sich aus der Kombination von Lappen-Präfabrikation und Tissue Engineering ergeben verdeutlichen, dass dieser rekonstruktive Ansatz kein Potential besitzt jemals in das chirurgische Routine-Repertoire zu avancieren und nach klinischer Etablierung aller Voraussicht nach eher individuell zu modifizierendes Konzept des rekonstruktiven Chirurgen mit mikrochirurgischen Fähigkeiten und Infrastruktur verbleibt (Guo L 2009): Ein vaskulärer Pedikel umfasst eine zuführende Arterie und ggf. begleitende Venen, die entweder im adventitiellen Gewebe enthalten sein können, aber auch in einer adhärenter Faszie, bzw. Muskel. Der Pedikel mag lokal vorhanden sein oder aber in Form eines Interponates erst mikrochirurgisch angelegt werden. Letztlich wird er in Kontakt zum definierten Spendergewebe platziert. Um die narbige Einbindung des dargestellten Gefäßstiels für nachfolgende chirurgische Schritte zu unterbinden und die Gefäßaussprossung gezielt an dem Pedikel-Ende zu konzentrieren, welches dem zu vaskularisierenden Gewebe anliegt, wird die Isolation entlang des Stiels mit nichtresorbierbaren Hülsen oder einer Folie empfohlen.

Trotzdem das in dieser Studie dargestellte Model ein vereinfachtes, aber repräsentatives Model zur Tissue Engineerten Lappenpräfabrikation in der Maus darstellt, in dem oben genannte Details wie die Pedikelkonstruktion aus einem Gefäßinterponat technisch nicht durchführbar sind, erfordert es ebenfalls mikrochirurgisches Handling und Infrastruktur.

Langfristig gilt es, das dargestellte Modell noch zu erweitern und den finalen Schritt der Präfabrikation umzusetzen: nach erfolgreicher Präfabrikation sollte das generierte Gewebe in den Defekt eingebracht werden, was klinisch mit lokalem Schwenken, bzw. freiem Lappentransfer zu praktizieren wäre. In dem hier dargestellten Model ist der freie Transfer ähnlich wie die Pedikelgeneration mit Gefäßinterponat aus gegeben Dimensionen unmöglich; denkbar wäre jedoch das spherische PU- Scaffold am femoralen Gefäßbündel exemplarisch nach proximal via Leistenband in eine abdominelle Tasche zu verlagern.

Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu ermitteln, ob sich hierbei evtl. die Notwendigkeit des bereits etablierten Lappen- Delays ergibt, d.h. eine Modifikation des Präfabrikationszeitraumes notwendig ist, oder aber beispielsweise die Kontaktfläche des Gefäßbündels zur Leitschiene verändert werden sollte.

In einer Arbeit aus dem Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass ein chirurgischer Delay des zu verlagernden Gewebes 6 Wochen nach Pedikel Implantation und 2 Wochen vor Lappentransfer die venöse Stauung des präfabrizierten Lappens signifikant senkt.

Nicht fehlen sollte zudem der Ausblick auf die Komponente „Prälamination“ in puncto chirurgischem Handling: Der Begriff Prälamination umfasst das Konzept verschiedene Schichten in einem Konstrukt zu kombinieren woraus sich letztendlich ein sogenannter Composite graft ergibt. Auch die Prälamination umfasst diverse chirurgische Einzelschritte:

Zunächst gilt es die einzelnen Schichten evtl. an einem axial vaskularisiertem Pedikel zu kombinieren, bevor sie in einem zweiten Schritt als Composite gestielt oder frei in den Defekt eingebracht werden können. Neben der Komponente Haut ist die Verwendung diverser autologer Materialien wie Knorpel, Knochen, Mucosa, Nerven etc. denkbar. Daneben ist beschrieben, Materialien exogenen Ursprungs, wie z.B. in vitro kultivierte Keratinozyten- Sheets, oder anderes bioengineertes Gewebe zu prälaminiieren.

6.3.4. Fazit

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es sich bei beschriebenem murinen Modell zur Untersuchung präfabrizierter Tissue Engineering Konstrukte um eine valide Variante bereits existierender Modelle (z.B. in der Ratte) handelt. Es ist technisch einfach durchführbar und rasch zu etablieren, relativ kostengünstig und ermöglicht die Implantation eines Konstruktes pro Hinterlauf.

Beschriebene Untersuchungen bahnen den Weg für zukünftige Experimente im Hinblick auf eine klinische Anwendung der Tissue engineerten Lappenpräfabrikation zur Rekonstruktion verschiedener Gewebearten. Gegenstand derzeitiger Nachfolge-Experimente an beschriebenem Modell beinhalten Untersuchungen über das zelluläre Verhalten besiedelter Implantate in-vivo, sowie die Mobilität der präfabrizierten Leitschienen am gestielten Pedikel im Sinne eines Lappen- Transfers. Nichts desto trotz gilt es, sämtliche Resultate aus dem hier vorgestellten Kleintiermodells im größeren in vivo Modell zu erproben; auch wenn es sich um ein in vivo Modell handelt, bietet die Maus keinen Versuchsaufbau, der mit menschlichen Rahmenbedingungen zu vergleichen ist und eignet sich daher vor allem für Fragestellungen bezüglich Grundlagenforschung. Dementsprechend bleibt zu betonen, dass die Untersuchung im Großtiermodell zur klinischen Etablierung unabdingbar ist.

7. Zusammenfassung

Biointegration in-vitro kultivierter Zellen in einen Organismus setzt ein gut vaskularisiertes Empfänger-Areal voraus. Diese Situation ist nicht zwingend an Arealen gegeben, an denen Bedarf an Gewebe-Generation oder Reparatur besteht. Die erweiternde Kombination des Tissue Engineering mit der axialen Prävaskularisierung stellt einen Lösungsansatz dieser Problematik dar

In dieser Studie wurde ein experimentelles Modell an der Maus zur Untersuchung präfabrizierter Neovaskularisation Tissue Engineerter Konstrukte etabliert, welches zukünftig eine technisch relativ einfache, zeit- und kostensparende Alternative zu bestehenden Modellen an Ratte, Kaninchen etc. bieten soll.

Untersucht wurde die Neovaskularisation zweier Gefäßkonfigurationen in Abhängigkeit des Faktors Zeit: um das femorale Gefäßbündel der Mäuse wurde ein Polyurethan-Schaum Plättchen gelegt. Dessen Isolation gegen umliegendes Gewebe erfolgte mit Silikonfolie. Zum einen wurde das Gefäßbündel als axialer Durchfluss belassen, zum anderen distal der PU Matrix ligiert. Bei jedem Tier wurde subkutan eine Kontroll-Matrix ohne Isolation eingebracht. Evaluationszeitpunkte betragen 1, 2, 3, 4 und 9 Wochen post Implantationem. In einem zweiten Versuchsdurchgang wurden mit bovinem und humanem Knorpel besiedelte Implantate an lediglich axialem Durchfluss präfabriziert und nach in vivo Verweildauer von 1 und 6 Wochen untersucht.

Die Auswertung erfolgte jeweils sowohl makroskopisch, als auch mikroskopisch im Hinblick auf Neovaskularisation (Summierung angeschnittener Gefäßlumina) und Zellmorphometrie. Die quantitative Auswertung der Gefäßdichte innerhalb der Matrices zeigte: konstante Steigerung innerhalb der ersten drei Wochen. Der Vergleich von mittigen, mit randständigen Schnitten beider Gruppen zeigte einen signifikant höheren Trend zur Neovaskularisation in unmittelbarer Gefäßstiel-Nähe (Skaffold-Mitte). In den Kontrollen verhielt es sich gegenteilig: signifikant mehr Neovaskularisation in nicht isolierter Skaffold-Peripherie, als im Zentrum. Die interkonnektiven Poren der gestielten Skaffolds waren durchsetzt mit fibrovaskulärem Neogewebe in Form initialer Zellnester teils entzündlichen Charakters, bis hin zur kompletten Füllung. Innerhalb der Kontrollen dominierte Adipogenese.

Nachdem die Ergebnisse des ersten Durchgangs erbracht hatten, dass im Ligatur-Modell die Gefahr der Gefäßbündel-Thrombosierung verstärkt gegeben ist, wurden die im zweiten Versuchsdurchgang besiedelten Leitschienen lediglich axial an das femorale Gefäßbündel von Mäusen implantiert.

Die Verwendung bovinen Knorpels zeigte zum großen Teil überzeugende Ergebnisse mit überwiegend homogener Knorpeldurchsetzung nach 6 Wochen in vivo Verweildauer; dieses Ergebnis ergab sich nicht im parallel laufenden Versuchsschenkel mit humanem Chondrozytenmaterial. Bei identischem Versuchsablauf erwies sich die Gewebeverteilung größtenteils inhomogen, bzw. imponierten die präfabrizierten Konstrukte an den Hinterläufen und die Nackenkontrollen leer oder entzündungsspezifisch durchsetzt. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Präfabrikation Tissue Engineerter Konstrukte in dem erarbeiteten Versuchsmodell in der Maus möglich ist. Nicht-signifikante Ausfälle und ein stets guter Allgemeinzustand der Tiere bestätigen dies.

Wie angenommen, erweist sich das Handling mit entsprechender mikrochirurgischer Infrastruktur als einfach und zeitsparend, die Haltung und anfallenden Materialkosten verhältnismäßig günstig und ideal für Versuchsaufbauten großer Fallzahlen.

Die reaktive Gewebefüllung der leer eingebrachten Polyurethan- Konstrukte mit der unvermeidlich assoziierten Fremdkörperassoziation in akzeptablem Rahmen deckt sich mit den Ergebnissen aus eigenen Voruntersuchungen und der Literatur.

Dementsprechend ist die hier durchgeführte vereinfachte Form der Präfabrikation, d.h. die pure Gefäßbündeldarstellung und Verlagerung an ein zu vaskularisierendes Gewebe/ Konstrukt ohne Naht oder Interposition (aufgrund winziger Dimensionen) auch in der Maus in dargestellter Weise als valide zu betrachten.

Die Herstellung von dreidimensionalen besiedelten Konstrukten aus einem Fibrin-Chondrozyten-Gemisch ist ebenfalls multipel beschrieben und konnte ohne Schwierigkeiten auf die kleineren Dimensionen, die für das Mausmodell notwendig waren übertragen werden.

Vergleichbar mit den vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an der Ratte zeigten sich bei der Verwendung bovinen Knorpels überwiegend überzeugende Ergebnisse, die sich allerdings im parallel laufenden Versuchsschenkel nicht uneingeschränkt auf humane Zellen übertragen ließen. Die Ursache muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein valides, murines Modell zur Lappen-Präfabrikation etabliert werden; zukünftig sollte es dazu dienen, Fragestellungen auf dem Weg zum maßgeschneiderten Tissue Engineering Verfahrens in die Klinik klären zu können. Modellmodifikationen, bzw. Erweiterungen sind möglich und praktikabel: Beispielsweise wäre es denkbar den klinisch relevanten Gewebettransfer evtl. durch gestielte Verlagerung des Konstruktes über das Leistenband der Maus zu simulieren.

8. Literaturverzeichnis

- Adams RH and Alitalo K (2007). "*Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 464-78.
- Ahmed TA, Dare EV and Hincke M (2008). "*Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications.*" *Tissue Eng Part B Rev* 14(2): 199-215.
- Ahsan T and Nerem RM (2005). "*Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry.*" *Orthod Craniofac Res* 8(3): 134-40.
- Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E and Naumann A (1998). "*Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester.*" *J Biomed Mater Res* 42(2): 172-81.
- Anderson DG, Burdick JA and Langer R (2004). "*Materials science. Smart biomaterials.*" *Science* 305(5692): 1923-4.
- Archer CW and Francis-West P (2003). "*The chondrocyte.*" *Int J Biochem Cell Biol* 35(4): 401-4.
- Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srouf S, Sturzl M, Horch RE and Kneser U (2007). "*Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts.*" *Tissue Eng* 13(7): 1549-60.
- Atala A (2000). "*Tissue engineering of artificial organs.*" *J Endourol* 14(1): 49-57.
- Bakamjian VY and Holbrook LA (1973). "*Prefabrication techniques in cervical pharyngo-oesophageal reconstruction.*" *Br J Plast Surg* 26(3): 214-22.
- Beier JP, Horch RE, Arkudas A, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Adamek E, Hess A and Kneser U (2009). "*De novo generation of axially vascularized tissue in a large animal model.*" *Microsurgery* 29(1): 42-51.
- Benninghoff A. DD (2003). *Anatomie*. München Urban und Fischer Verlag
- Bloom W FD (1975). *A Textbook of Histology*. Philadelphia, WS Saunders
- Bojescul JA, Polly DW, Jr., Kuklo TR, Allen TW and Wieand KE (2005). "*Backfill for iliac-crest donor sites: a prospective, randomized study of coralline hydroxyapatite.*" *Am J Orthop* 34(8): 377-82.
- Bomhard E and Mohr U (1989). "*Spontaneous tumors in NMRI mice from carcinogenicity studies.*" *Exp Pathol* 36(3): 129-45.
- Borden M, Attawia M, Khan Y and Laurencin CT (2002). "*Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation.*" *Biomaterials* 23(2): 551-9.

- Britt JC and Park SS (1998). "*Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material.*" Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124(6): 671-7.
- Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C and Vacanti CA (1998). "*Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage.*" J Biomater Sci Polym Ed 9(5): 475-87.
- Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J and Vacanti CA (1997). "*Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear.*" Plast Reconstr Surg 100(2): 297-302; discussion 303-4.
- Carmeliet P (2005). "*Angiogenesis in life, disease and medicine.*" Nature 438(7070): 932-6.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D and Persico MG (2001). "*Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.*" Nat Med 7(5): 575-83.
- Carranza-Bencano A, Garcia-Paino L, Armas Padron JR and Cayuela Dominguez A (2000). "*Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months.*" Osteoarthritis Cartilage 8(5): 351-8.
- Cassell OC, Hofer SO, Morrison WA and Knight KR (2002). "*Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states.*" Br J Plast Surg 55(8): 603-10.
- Chang R, Nam J and Sun W (2008). "*Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing.*" Tissue Eng Part A 14(1): 41-8.
- Chapekar MS (2000). "*Tissue engineering: challenges and opportunities.*" J Biomed Mater Res 53(6): 617-20.
- Ciorba A and Martini A (2006). "*Tissue engineering and cartilage regeneration for auricular reconstruction.*" Int J Pediatr Otorhinolaryngol 70(9): 1507-15.
- Cohen J and Lacroix P (1955). "*Bone and cartilage formation by periosteum; assay of experimental autogenous grafts.*" J Bone Joint Surg Am 37-A(4): 717-30.
- Cournil-Henrionnet C, Huselstein C, Wang Y, Galois L, Mainard D, Decot V, Netter P, Stoltz JF, Muller S, Gillet P and Watrin-Pinzano A (2008). "*Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal*

- stem cells and chondrocytes during monolayer expansion.* Biorheology 45(3-4): 513-26.
- Cronin KJ, Messina A, Knight KR, Cooper-White JJ, Stevens GW, Penington AJ and Morrison WA (2004). "New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials." *Plast Reconstr Surg* 113(1): 260-9.
- Csaki C, Schneider PR and Shakibaei M (2008). "Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering." *Ann Anat.*
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S and Huang W (2000). "Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation." *Matrix Biol* 19(5): 389-94.
- DeLise AM, Fischer L and Tuan RS (2000). "Cellular interactions and signaling in cartilage development." *Osteoarthritis Cartilage* 8(5): 309-34.
- Drury JL, Dennis RG and Mooney DJ (2004). "The tensile properties of alginate hydrogels." *Biomaterials* 25(16): 3187-99.
- Egginton S and Gerritsen M (2003). "Lumen formation: in vivo versus in vitro observations." *Microcirculation* 10(1): 45-61.
- Emans PJ, Surtel DA, Frings EJ, Bulstra SK and Kuijer R (2005). "In vivo generation of cartilage from periosteum." *Tissue Eng* 11(3-4): 369-77.
- Erol OO (1976). "The transformation of a free skin graft into a vascularized pedicled flap." *Plast Reconstr Surg* 58(4): 470-7.
- Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A and Blunk T (2007). "Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering." *Biomaterials* 28(1): 55-65.
- Feigl W, Susani M, Ulrich W, Matejka M, Losert U and Sinzinger H (1985). "Organisation of experimental thrombosis by blood cells. Evidence of the transformation of mononuclear cells into myofibroblasts and endothelial cells." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406(2): 133-48.
- Ferrara N (2005). "The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis." *Exs(94)*: 209-31.
- Folkman J and Hochberg M (1973). "Self-regulation of growth in three dimensions." *J Exp Med* 138(4): 745-53.
- Forni M (2007). "Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science." *Vet Res Commun* 31 Suppl 1: 43-7.
- Fu FH, Zurakowski D, Browne JE, Mandelbaum B, Erggelet C, Moseley JB, Jr., Anderson AF and Micheli LJ (2005). "Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the

- knee: an observational cohort study with 3-year follow-up.*" Am J Sports Med 33(11): 1658-66.
- Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Zand S, Vacanti JP and Fauza DO (2005). "*Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells.*" Stem Cells 23(7): 958-64.
- Fujisato T, Sajiki T, Liu Q and Ikada Y (1996). "*Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold.*" Biomaterials 17(2): 155-62.
- Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J and Behrens P (2000). "*Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study.*" Ann Anat 182(4): 303-10.
- Gercek I, Tigli RS and Gumusderelioglu M (2008). "*A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying.*" J Biomed Mater Res A 86(4): 1012-22.
- Gerhardt H and Betsholtz C (2003). "*Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis.*" Cell Tissue Res 314(1): 15-23.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D and Betsholtz C (2003). "*VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia.*" J Cell Biol 161(6): 1163-77.
- Giannoni P, Crovace A, Malpeli M, Maggi E, Arbico R, Cancedda R and Dozin B (2005). "*Species variability in the differentiation potential of in vitro-expanded articular chondrocytes restricts predictive studies on cartilage repair using animal models.*" Tissue Eng 11(1-2): 237-48.
- Giselbrecht S (2005). *Polymere, mikrostrukturierte Zellträger für das Tissue Engineering.* Fakultät für Maschinenbau, Institut für Mikrostrukturtechnik, Institut für biologische Grenzflächen. Karlsruhe, Universität Karlsruhe (TH). Doktor der Ingenieurwissenschaften: 158.
- Giselbrecht S, Gottwald E, Knedlitschek G, Weibezahn KF, Welle A, Guber AE, Herrmann D, Muslija A and Schomburg WK (2002). "*Further development of microstructured culture systems and their use in tissue engineering.*" Biomed Tech (Berl) 47 Suppl 1 Pt 1: 373-6.
- Gloeckner H and Lemke HD (2001). "*New miniaturized hollow-fiber bioreactor for in vivo like cell culture, cell expansion, and production of cell-derived products.*" Biotechnol Prog 17(5): 828-31.
- Glowacki J, Trepman E and Folkman J (1983). "*Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes.*" Proc Soc Exp Biol Med 172(1): 93-8.

- Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC and Mikos AG (2001). "*Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds.*" *Biomaterials* 22(11): 1279-88.
- Gottwald E, Giselbrecht S, Augspurger C, Lahni B, Dambrowsky N, Truckenmuller R, Piotter V, Gietzelt T, Wendt O, Pfleging W, Welle A, Rolletschek A, Wobus AM and Weibezahn KF (2007). "*A chip-based platform for the in vitro generation of tissues in three-dimensional organization.*" *Lab Chip* 7(6): 777-85.
- Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S and Alini M (2003). "*The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations.*" *Biomaterials* 24(28): 5163-71.
- Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R and Manji R (1997). "*Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts.*" *J Biomed Mater Res* 34(2): 211-20.
- Griffith LG and Naughton G (2002). "*Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities.*" *Science* 295(5557): 1009-14.
- Grimshaw MJ and Mason RM (2001). "*Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression in vitro by oxygen tension.*" *Osteoarthritis Cartilage* 9(4): 357-64.
- Guo L and Pribaz JJ (2009). "*Clinical flap prefabrication.*" *Plast Reconstr Surg* 124(6 Suppl): e340-50.
- Hall BK and Miyake T (2000). "*All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development.*" *Bioessays* 22(2): 138-47.
- Ham AW, Tisdall FF and Drake TGH (1938). "*Experimental non calcification of callus simulating non-union.*" *Journal of Bone and Joint Surgery* 20: 345-352.
- Hannover T *Hyaliner Knorpel* tiho hannover Ausschnitt aus hyalinem Knorpel: Peripher vereizelte, rundovale Chondrozyten; zentral rundliche Knorpelzellgruppen eingelagert in maskiert homogene Interzellulärsatz . .
- Hardingham T, Tew S and Murdoch A (2002). "*Tissue engineering: chondrocytes and cartilage.*" *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S63-8.
- Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH and Thonar EJ (1992). "*Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads.*" *Matrix* 12(2): 116-29.
- Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE and Thonar EJ (1994). "*Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads.*" *J Cell Sci* 107 (Pt 1): 17-27.
- Havla JB, Lotz AS, Richter E, Froelich K, Hagen R, Staudenmaier R and Kleinsasser NH "*Cartilage tissue engineering for auricular reconstruction: in vitro*

- evaluation of potential genotoxic and cytotoxic effects of scaffold materials.*" Toxicol In Vitro 24(3): 849-53.
- Hewitt AT, Kleinman HK, Pennypacker JP and Martin GR (1980). "*Identification of an adhesion factor for chondrocytes.*" Proc Natl Acad Sci U S A 77(1): 385-8.
- Hickey MJ, Wilson Y, Hurley JV and Morrison WA (1998). "*Mode of vascularization of control and basic fibroblast growth factor-stimulated prefabricated skin flaps.*" Plast Reconstr Surg 101(5): 1296-304; discussion 1305-6.
- Hiles M and Hodde J (2006). "*Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial.*" Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.
- Hirase Y, Valauri FA and Buncke HJ (1988). "*Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: an experimental model in the rabbit.*" Ann Plast Surg 21(4): 342-7.
- Hirase Y, Valauri FA and Buncke HJ (1988). "*Prefabricated sensate myocutaneous and osteomyocutaneous free flaps: an experimental model. Preliminary report.*" Plast Reconstr Surg 82(3): 440-6.
- Hirase Y, Valauri FA, Buncke HJ and Newlin LY (1987). "*Customized prefabricated neovascularized free flaps.*" Microsurgery 8(4): 218-24.
- Hoang NT, Hoehnke C, Hien PT, Mandlik V, Feucht A and Staudenmaier R (2009). "*Neovascularization and free microsurgical transfer of in vitro cartilage-engineered constructs.*" Microsurgery 29(1): 52-61.
- Hoang NT, Kloeppe M, Staudenmaier R, Werner J and Biemer E (2005). "*Prefabrication of large fasciocutaneous flaps using an isolated arterialised vein as implanted vascular pedicle.*" Br J Plast Surg 58(5): 632-9.
- Hoang NT, Kloeppe M, Werner J, Staudenmaier R and Biemer E (2005). "*Proposed new method for angiographically quantifying neovascularization in prefabricated flaps.*" Microsurgery 25(3): 220-6.
- Hoang NT, Staudenmaier R, Hai LH, Hai le H, Doan le V and Hoehnke C (2009). "*Successful re-construction of a large tissue defect using a free pre-fabricated flap with purely implanted arterialised venous loop.*" J Plast Reconstr Aesthet Surg 62(7): e225-8.
- Hong KM, Burdick MD, Phillips RJ, Heber D and Strieter RM (2005). "*Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice.*" Faseb J 19(14): 2029-31.
- Horch RE (2006). "*Future perspectives in tissue engineering.*" J Cell Mol Med 10(1): 4-6.

- Hutmacher DW (2001). "*Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives.*" J Biomater Sci Polym Ed 12(1): 107-24.
- Hutmacher DW, Ng KW, Kaps C, Sittinger M and Klaring S (2003). "*Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier.*" Biomaterials 24(24): 4445-58.
- Hwang NS, Varghese S and Elisseeff J (2008). "*Derivation of chondrogenically-committed cells from human embryonic cells for cartilage tissue regeneration.*" PLoS ONE 3(6): e2498.
- Hyakusoku H, Okubo M, Umeda T and Fumiiri M (1987). "*A prefabricated hair-bearing island flap for lip reconstruction.*" Br J Plast Surg 40(1): 37-9.
- Ignatova M, Starbova K, Markova N, Manolova N and Rashkov I (2006). "*Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol).*" Carbohydr Res 341(12): 2098-107.
- IPTS (2003). *Human tissue-engineered products - Today's markets and future prospects.* Seville, Institute for Prospective TEchnological Studies 2.
- Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J and Vacanti JP (1999). "*Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering.*" J Bone Joint Surg Am 81(3): 306-16.
- Itoh Y (1992). "*An experimental study of prefabricated flaps using silicone sheets, with reference to the vascular patternization process.*" Ann Plast Surg 28(2): 140-6.
- Jain RK (2003). "*Molecular regulation of vessel maturation.*" Nat Med 9(6): 685-93.
- Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG and Fukumura D (2005). "*Engineering vascularized tissue.*" Nat Biotechnol 23(7): 821-3.
- Jancar J, Slovikova A, Amler E, Krupa P, Kecova H, Planka L, Gal P and Necas A (2007). "*Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering.*" Physiol Res 56 Suppl 1: S17-25.
- Jansen EJ, Emans PJ, Guldemond NA, van Rhijn LW, Welting TJ, Bulstra SK and Kuijer R (2008). "*Human periosteum-derived cells from elderly patients as a source for cartilage tissue engineering?*" J Tissue Eng Regen Med 2(6): 331-9.
- Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K and Miyazawa K (2005). "*VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling.*" J Cell Sci 118(Pt 16): 3759-68.
- Khillan JS (2006). "*Generation of chondrocytes from embryonic stem cells.*" Methods Mol Biol 330: 161-70.

- Khouri RK, Koudsi B, Deune EG, Hong SP, Ozbek MR, Serdar CM, Song SZ and Pierce GF (1993). "*Tissue generation with growth factors.*" *Surgery* 114(2): 374-9; discussion 379-80.
- Khouri RK, Upton J and Shaw WW (1991). "*Prefabrication of composite free flaps through staged microvascular transfer: an experimental and clinical study.*" *Plast Reconstr Surg* 87(1): 108-15.
- Khouri RK, Upton J and Shaw WW (1992). "*Principles of flap prefabrication.*" *Clin Plast Surg* 19(4): 763-71.
- Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Mooney D, Upton J, Puelacher WC and Vacanti CA (1994). "*Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers.*" *Plast Reconstr Surg* 94(2): 233-7; discussion 238-40.
- Kloppel M, Nguyen TH, Graf P, Laubenbacher C, Hohnke C, Schwaiger M and Biemer E (1997). "*[Neovascularization of pre-formed tissue flaps in relation to arteriovenous blood flow of the implanted vascular pedicle. Experimental study in the rabbit].*" *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 114: 1379-80.
- Kluge F. SE (1999). *Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache* Berlin, De Gruyter.
- Koch RJ and Gorti GK (2002). "*Tissue engineering with chondrocytes.*" *Facial Plast Surg* 18(1): 59-68.
- Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD and Vollmar B (2000). "*Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel.*" *J Biomed Mater Res* 49(2): 192-9.
- Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS and Frondoza CG (2000). "*Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes.*" *J Biomed Mater Res* 51(4): 586-95.
- Langer R and Vacanti JP (1993). "*Tissue engineering.*" *Science* 260(5110): 920-6.
- Laschke MW, Haufel JM, Thorlacius H and Menger MD (2005). "*New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo.*" *J Biomed Mater Res A* 74(4): 696-704.
- Lee CR, Breinan HA, Nehrer S and Spector M (2000). "*Articular cartilage chondrocytes in type I and type II collagen-GAG matrices exhibit contractile behavior in vitro.*" *Tissue Eng* 6(5): 555-65.
- Lee M, Dunn JC and Wu BM (2005). "*Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing.*" *Biomaterials* 26(20): 4281-9.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN and de Crombrughe B (1997). "*SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene.*" *Mol Cell Biol* 17(4): 2336-46.

- Lefebvre V, Li P and de Crombrughe B (1998). "A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene." *Embo J* 17(19): 5718-33.
- Leong KF, Cheah CM and Chua CK (2003). "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs." *Biomaterials* 24(13): 2363-78.
- Leonhardt H (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* Stuttgart, Thieme - Verlag.
- Levenberg S (2005). "Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications." *Curr Opin Biotechnol* 16(5): 516-23.
- Liu Y, Shu XZ and Prestwich GD (2006). "Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix." *Tissue Eng* 12(12): 3405-16.
- Lokmic Z and Mitchell GM (2008). "Engineering the microcirculation." *Tissue Eng Part B Rev* 14(1): 87-103.
- Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, Thompson EW and Mitchell GM (2007). "An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct." *Faseb J* 21(2): 511-22.
- Lydon MJ, Minett TW and Tighe BJ (1985). "Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture." *Biomaterials* 6(6): 396-402.
- Mahmood TA, Miot S, Frank O, Martin I, Riesle J, Langer R and van Blitterswijk CA (2006). "Modulation of chondrocyte phenotype for tissue engineering by designing the biologic-polymer carrier interface." *Biomacromolecules* 7(11): 3012-8.
- Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, Wilson C, Martens DE, Tramper J, van Blitterswijk CA and Riesle J (2005). "The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage." *Biomaterials* 26(1): 63-72.
- Manis JP (2007). "Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize." *N Engl J Med* 357(24): 2426-9.
- Martin JA and Buckwalter JA (1998). "Effects of fibronectin on articular cartilage chondrocyte proteoglycan synthesis and response to insulin-like growth factor-I." *J Orthop Res* 16(6): 752-7.
- Matsuda K, Nagasawa N, Suzuki S, Isshiki N and Ikada Y (1995). "In vivo chondrogenesis in collagen sponge sandwiched by perichondrium." *J Biomater Sci Polym Ed* 7(3): 221-9.

- Miot S, Scandiucci de Freitas P, Wirz D, Daniels AU, Sims TJ, Hollander AP, Mainil-Varlet P, Heberer M and Martin I (2006). "*Cartilage tissue engineering by expanded goat articular chondrocytes.*" J Orthop Res 24(5): 1078-85.
- Miot S, Woodfield T, Daniels AU, Suetterlin R, Peterschmitt I, Heberer M, van Blitterswijk CA, Riesle J and Martin I (2005). "*Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition.*" Biomaterials 26(15): 2479-89.
- Moroni L, de Wijn JR and van Blitterswijk CA (2008). "*Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds.*" J Biomater Sci Polym Ed 19(5): 543-72.
- Morrison WA, Dvir E, Doi K, Hurley JV, Hickey MJ and O'Brien BM (1990). "*Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: an experimental study in rabbits.*" Br J Plast Surg 43(6): 645-54.
- Morton DB and Griffiths PH (1985). "*Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment.*" Vet Rec 116(16): 431-6.
- Moses MA, Sudhalter J and Langer R (1990). "*Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage.*" Science 248(4961): 1408-10.
- Nakata K, Ono K, Miyazaki J, Olsen BR, Muragaki Y, Adachi E, Yamamura K and Kimura T (1993). "*Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion.*" Proc Natl Acad Sci U S A 90(7): 2870-4.
- Naumann A, Aigner J, Staudenmaier R, Seemann M, Bruening R, Englmeier KH, Kadedge G, Pavesio A, Kastenbauer E and Berghaus A (2003). "*Clinical aspects and strategy for biomaterial engineering of an auricle based on three-dimensional stereolithography.*" Eur Arch Otorhinolaryngol 260(10): 568-75.
- Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, Kastenbauer ER and Caplan AI (2004). "*Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system.*" Tissue Eng 10(11-12): 1695-706.
- Nerem RM (2006). "*Tissue engineering: the hope, the hype, and the future.*" Tissue Eng 12(5): 1143-50.
- Neumeister MW, Wu T and Chambers C (2006). "*Vascularized tissue-engineered ears.*" Plast Reconstr Surg 117(1): 116-22.
- Nguyen LL and D'Amore PA (2001). "*Cellular interactions in vascular growth and differentiation.*" Int Rev Cytol 204: 1-48.
- Nguyen TH, Kloepfel M, Staudenmaier R, Werner J and Biemer E (2005). "*Study of the neovascularisation of prefabrication of flaps using a silicone sheet and an isolated arterial pedicle: experimental study in rabbits.*" Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 39(6): 326-33.

- Nguyen TH, Kloppel M, Staudenmaier R and Biemer E (2004). "[*Experimental investigation of neovascularisation in large prefabricated flaps after arteriovenous pedicle implantation*]." *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36(4): 212-7.
- Page-McCaw A, Ewald AJ and Werb Z (2007). "*Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3): 221-33.
- Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vacanti JP and Vacanti CA (1995). "*Injectable cartilage*." *Plast Reconstr Surg* 96(6): 1390-8; discussion 1399-400.
- Pandya NM, Dhalla NS and Santani DD (2006). "*Angiogenesis--a new target for future therapy*." *Vascul Pharmacol* 44(5): 265-74.
- Park MS and Cha CI (1993). "*Biochemical aspects of autologous fibrin glue derived from ammonium sulfate precipitation*." *Laryngoscope* 103(2): 193-6.
- Patel ZS and Mikos AG (2004). "*Angiogenesis with biomaterial-based drug- and cell-delivery systems*." *J Biomater Sci Polym Ed* 15(6): 701-26.
- Peltola SM, Melchels FP, Grijpma DW and Kellomaki M (2008). "*A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes*." *Ann Med* 40(4): 268-80.
- Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR and Sittinger M (2000). "*Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits*." *Biomaterials* 21(11): 1145-53.
- Polykandriotis E, Horch RE, Arkudas A, Labanaris A, Brune K, Greil P, Bach AD, Kopp J, Hess A and Kneser U (2006). "*Intrinsic versus extrinsic vascularization in tissue engineering*." *Adv Exp Med Biol* 585: 311-26.
- Pomahac B, Svensjo T, Yao F, Brown H and Eriksson E (1998). "*Tissue engineering of skin*." *Crit Rev Oral Biol Med* 9(3): 333-44.
- Post MJ (2002). "*Angiogenesis: initiation and maintenance*." *Ann N Y Acad Sci* 961: 249-50.
- Pribaz JJ, Fine N and Orgill DP (1999). "*Flap prefabrication in the head and neck: a 10-year experience*." *Plast Reconstr Surg* 103(3): 808-20.
- Pribaz JJ and Fine NA (1994). "*Prelamination: defining the prefabricated flap--a case report and review*." *Microsurgery* 15(9): 618-23.
- Pribaz JJ and Fine NA (2001). "*Prefabricated and prelaminated flaps for head and neck reconstruction*." *Clin Plast Surg* 28(2): 261-72, vii.
- Pribitkin EA, Ambro BT, Bloeden E and O'Hara BJ (2004). "*Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft*." *Laryngoscope* 114(9 Pt 2 Suppl 102): 1-19.

- Ratner BD (1993). "New ideas in biomaterials science--a path to engineered biomaterials." *J Biomed Mater Res* 27(7): 837-50.
- Ren LL, Ma DY, Feng X, Mao TQ, Liu YP and Ding Y (2008). "A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop." *Med Hypotheses* 71(5): 737-40.
- Ren LL, Ma DY, Feng X, Mao TQ, Liu YP and Ding Y (2008). "A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop." *Med Hypotheses*.
- Rhodin JA and Fujita H (1989). "Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital video and electron microscope analyses." *J Submicrosc Cytol Pathol* 21(1): 1-34.
- Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L and Dammacco F (2002). "Endothelial cell heterogeneity and organ specificity." *J Hematother Stem Cell Res* 11(1): 81-90.
- Richmon JD, Sage A, Van Wong W, Chen AC, Sah RL and Watson D (2006). "Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage." *Am J Rhinol* 20(5): 496-501.
- Roach HI (1997). "New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix." *J Bone Miner Res* 12(5): 795-805.
- Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD and Vacanti CA (1999). "Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage." *Plast Reconstr Surg* 103(4): 1111-9.
- Rophael JA, Craft RO, Palmer JA, Hussey AJ, Thomas GP, Morrison WA, Penington AJ and Mitchell GM (2007). "Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis." *Am J Pathol* 171(6): 2048-57.
- Rotter N, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Hansen MC, Vacanti CA and Bonassar LJ (2002). "Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage." *Arch Biochem Biophys* 403(1): 132-40.
- Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SH, van der Ven-Jongekrijg J, van der Graaf F and Wollersheim H (2002). "Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis." *J Vasc Surg* 35(4): 701-6.
- Rucker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mulhaupt R, Gellrich NC and Menger MD (2006). "Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice." *Biomaterials* 27(29): 5027-38.

- Schachar NS, Cucheran DJ, McGann LE, Novak KA and Frank CB (1994). "*Metabolic activity of bovine articular cartilage during refrigerated storage.*" J Orthop Res 12(1): 15-20.
- Schimming R and Schmelzeisen R (2004). "*Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation.*" J Oral Maxillofac Surg 62(6): 724-9.
- Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD and Breusch SJ (2003). "*[Bone substitutes].*" Orthopade 32(1): 2-10.
- Schultheiss D, Bloom DA, Wefer J and Jonas U (2000). "*Tissue engineering from Adam to the zygote: historical reflections.*" World J Urol 18(1): 84-90.
- Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC and Gospodarowicz D (1987). "*Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth.*" Nature 325(6101): 257-9.
- Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson A, Matthew HW, Evans CH, Fu FH and Suh JK (2000). "*GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis.*" J Biomed Mater Res 49(4): 534-41.
- Shen ZY (1981). "*[Vascular implantation into skin flap to form an axial pattern skin flap: experimental study (author's transl)].*" Zhonghua Wai Ke Za Zhi 19(11): 692-5.
- Shieh SJ, Terada S and Vacanti JP (2004). "*Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies.*" Biomaterials 25(9): 1545-57.
- Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA and Yaremchuk MJ (1999). "*Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer.*" Plast Reconstr Surg 103(7): 1809-18.
- Singh Khillan J (2007). "*Differentiation of embryonic stem cells into cartilage cells.*" Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 1: Unit 1F 1.
- Sittinger M, Schultz O, Keyszer G, Minuth WW and Burmester GR (1997). "*Artificial tissues in perfusion culture.*" Int J Artif Organs 20(1): 57-62.
- Sobotta J. WU (2003). *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie.* München Urban und Fischer Verlag
- Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huibregtse BA, Goldberg VM and Caplan AI (2000). "*Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects.*" J Orthop Res 18(5): 773-80.
- Spector M (2002). "*Novel cell-scaffold interactions encountered in tissue engineering: contractile behavior of musculoskeletal connective tissue cells.*" Tissue Eng 8(3): 351-7.

- Speer DP, Chvapil M, Volz RG and Holmes MD (1979). "*Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants.*" Clin Orthop Relat Res(144): 326-35.
- Staudenmaier R, Hoang TN, Kleinsasser N, Schurr C, Frolich K, Wenzel MM and Aigner J (2004). "*Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage.*" J Reconstr Microsurg 20(7): 555-64.
- Sterodimas A, de Faria J, Correa WE and Pitanguy I (2009). "*Tissue engineering and auricular reconstruction: a review.*" J Plast Reconstr Aesthet Surg 62(4): 447-52.
- Stockwell R (1979). *Biologiy of Cartilage Cells*. New York, Cambridge University Press.
- Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S and Jimenez SA (2001). "*Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors.*" Biochem J 360(Pt 2): 461-70.
- Suh SW, Shin JY, Kim J, Kim J, Beak CH, Kim DI, Kim H, Jeon SS and Choo IW (2002). "*Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique.*" Asaio J 48(5): 460-4.
- Takato T, Komuro Y, Yonehara H and Zuker RM (1993). "*Prefabricated venous flaps: an experimental study in rabbits.*" Br J Plast Surg 46(2): 122-6.
- Tan BK, Chen HC, He TM and Song IC (2004). "*Flap prefabrication - the bridge between conventional flaps and tissue-engineered flaps.*" Ann Acad Med Singapore 33(5): 662-6.
- Tanaka Y, Sung KC, Fumimoto M, Tsutsumi A, Kondo S, Hinohara Y and Morrison WA (2006). "*Prefabricated engineered skin flap using an arteriovenous vascular bundle as a vascular carrier in rabbits.*" Plast Reconstr Surg 117(6): 1860-75.
- Tanaka Y, Sung KC, Tsutsumi A, Ohba S, Ueda K and Morrison WA (2003). "*Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation?*" Plast Reconstr Surg 112(6): 1636-44.
- The Hoang N, Kloeppel M, Staudenmaier R, Schweinbeck S and Biemer E (2005). "*Neovascularization in prefabricated flaps using a tissue expander and an implanted arteriovenous pedicle.*" Microsurgery 25(3): 213-9.
- Thomas GP, Hemmrich K, Abberton KM, McCombe D, Penington AJ, Thompson EW and Morrison WA (2008). "*Zymosan-induced inflammation stimulates neo-adipogenesis.*" Int J Obes (Lond) 32(2): 239-48.

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM (1998). "*Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.*" *Science* 282(5391): 1145-7.
- Ting V, Sims CD, Brecht LE, McCarthy JG, Kasabian AK, Connelly PR, Elisseeff J, Gittes GK and Longaker MT (1998). "*In vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes.*" *Ann Plast Surg* 40(4): 413-20; discussion 420-1.
- Togo T, Utani A, Naitoh M, Ohta M, Tsuji Y, Morikawa N, Nakamura M and Suzuki S (2006). "*Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction.*" *Lab Invest* 86(5): 445-57.
- Toole BP (2001). "*Hyaluronan in morphogenesis.*" *Semin Cell Dev Biol* 12(2): 79-87.
- Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP and Shufflebarger J (2001). "*Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone.*" *N Engl J Med* 344(20): 1511-4.
- Vacanti CA, Langer R, Schloo B and Vacanti JP (1991). "*Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation.*" *Plast Reconstr Surg* 88(5): 753-9.
- Vacanti CA and Vacanti JP (1994). "*Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches.*" *Otolaryngol Clin North Am* 27(1): 263-76.
- van Osch GJ, van den Berg WB, Hunziker EB and Hauselmann HJ (1998). "*Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes.*" *Osteoarthritis Cartilage* 6(3): 187-95.
- van Ravenswaaij-Arts CM and Losekoot M (2001). "*[From gene to disease; achondroplasia and other skeletal dysplasias due to an activating mutation in the fibroblast growth factor].*" *Ned Tijdschr Geneesk* 145(22): 1056-9.
- Vert M (2009). "*Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts.*" *J Mater Sci Mater Med* 20(2): 437-46.
- Vert M, Li S and Garreau H (1992). "*New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids.*" *Clin Mater* 10(1-2): 3-8.
- Wang YJ, Liu HL, Guo HT, Wen HW and Liu J (2004). "*Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich.*" *World J Gastroenterol* 10(5): 699-702.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J,

- Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC and Lander ES (2002). "*Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.*" *Nature* 420(6915): 520-62.
- Weiser L, Bhargava M, Attia E and Torzilli PA (1999). "*Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels.*" *Tissue Eng* 5(6): 533-44.
- Wen X and Tresco PA (2006). "*Fabrication and characterization of permeable degradable poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels.*" *Biomaterials* 27(20): 3800-9.
- Williams D (2007). "*Metastable biocompatibility: a new approach.*" *Med Device Technol* 18(3): 8, 10-1.
- Wong VW, Rustad KC, Longaker MT and Gurtner GC "*Tissue engineering in plastic surgery: a review.*" *Plast Reconstr Surg* 126(3): 858-68.
- Zamir T (2006). "*Killing for knowledge.*" *J Appl Philos* 23(1): 17-40.
- Zaucke F, Dinser R, Maurer P and Paulsson M (2001). "*Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes.*" *Biochem J* 358(Pt 1): 17-24.
- Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R and Griffith LG (2001). "*Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition.*" *Tissue Eng* 7(5): 557-72.
- Zerega B, Cermelli S, Bianco P, Cancedda R and Cancedda FD (1999). "*Parathyroid hormone [PTH(1-34)] and parathyroid hormone-related protein [PTHrP(1-34)] promote reversion of hypertrophic chondrocytes to a prehypertrophic proliferating phenotype and prevent terminal differentiation of osteoblast-like cells.*" *J Bone Miner Res* 14(8): 1281-9.
- Zhao H, Ma L, Gong Y, Gao C and Shen J (2008). "*A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation.*" *J Mater Sci Mater Med*.

9. Abkürzungsverzeichnis

AA	Antibiotic and Antimykotic
ALP	Alkalische Phosphatase
AEC	3 Amino-9-ethylcarbacol
CAD	Computer Aided Design
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Desoxyribonucleicacid, Desoxyribonukleinsäure
ChDI	Chondrocyte derived Inhibitor
CO ₂	Kohlendioxid
CSD	Critical size defect, Defekt kritischer Größe
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle´s Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
ETOH	Ethanol
FDM	Fuse Deposition Modelling
FKS	Fetales Kälberserum
G	Gauge
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
hMSC	Humane MesenchymalStem Cells
HRP	Horse Radish Peroxidase
i. m.	Intramuskulär
i.p.	Intraperitoneal
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
LOM	Laminated Object Modelling
mAmp	Milliampere
MEM	modified eagle medium
MMA	Methylmetacrylat
mRNA	messenger Ribo Nucleic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMMA	Polymethylmetacrylat
PU	Polyurethan
PVC	Polyvinylchlorid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transkriptase polymerase chain reaction
s.c.	subcutan
SCPL	Solvent Casting and Particulate Leaching
TE	Tissue Engineering
TGF	Thrombocyte Growth Factor
TSchG	Tierschutzgesetz
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units/ml
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung
µCT	Micro-Computertomographie

10. Anhang

10.1. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Rainer Staudenmaier für die Überlassung des Themas.

Dank seiner umfangreichen Förderung, wegweisenden Ratschläge und außergewöhnlichen Betreuung, die weit über die einer Doktorarbeit hinausging war es mir möglich dieses Projekt zu bestreiten.

Vor allem gilt mein besonderer Dank Anne Hills (und ihren Kolleginnen) für ihr unermüdliches und verlässliches Engagement während der Entstehung dieser Arbeit, für die präzise tatkräftige Unterstützung und die stets freundschaftlichen, aufmunternden Worte. Ihr ist es mitunter zuzuschreiben, dass ich ausnahmslos gerne das Labor besucht habe.

Bei Frau Dipl. math. Raymonde Busch und Alexander Hapfelmeier möchte ich mich ganz herzlich für ihre Geduld und Hilfe am statistischen Anteil der Arbeit bedanken.

Auch Frau Dr. rer. nat. Magdalene Wenzel bin ich für ihre allumfassende Hilfestellung und fachliche Unterstützung während der Anfänge der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Dem OP- Schwesternteam aus der HNO-Heilkunde und der Experimentellen Chirurgie im Klinikum Rechts der Isar der TU München danke ich für die freundliche Unterstützung bei die Biopsie-gewinnung und Durchführung sämtlicher experimenteller chirurgischer Eingriffe.

Für den reibungslosen Ablauf in der Tierhaltung danke ich stellvertretend für das gesamte Tierpflegerteam Herrn Dr. vet. Peter Scheuber, Frau PD Dr. vet. Julia Henke, Herrn Dr. vet. Thomas Brill und Herrn Dr. vet. Johannes Schwarz. Letzteren gillt mein besonderer Dank noch für die Tatkräftige Unterstützung im Umgang mit den Tieren.

Insgesamt möchte ich mich noch bei sämtlichen Beteiligten der Arbeitsgruppe Regenerative Medizin und Tissue Engineering bedanken, mit denen ich den Ablauf umfassender interdisziplinärer wissenschaftlicher Projekte kennenlernen durfte. Im Besonderen bedanke ich mich hiermit bei der Firma Polymaterials für die Bereitstellung der Implantate und den Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie aus dem Klinikum Innenstadt in München für die freundliche Aufnahme und Bereitsellung sämtlicher Räumlichkeiten.

Nicht zuletzt geht ein herzlicher Dank an meine Freunde und Familie, die mir mit großer Geduld und Selbstverständlichkeit stets einen Ausgleich und eine Ergänzung während der Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben. Ihr Verständnis, ihre unermüdliche Motivation und allumfassende Unterstützung waren und sind für mich unverzichtbar.

10.2 Lebenslauf

Name: Veronika Elisabeth Maria Mandlik
 Geburtsdatum: 26.02.1982
 Geburtsort:: München
 Eltern: Dr. med Wolfgang u. Elisabeth Mandlik,
 geb.Pettmesser
 Geschwister: Lucia, geboren 1980

Persönliche Daten

geboren am 26. Februar 1982 in München
 Familienstand ledig
 Nationalität deutsch

Beruf

seit 10/2009 Assistenzärztin in der Abteilung für Plastische-, Hand- und Mikrochirurgie unter Dr. Andreas Schmidt an der BG- Unfallklinik Murnau

Studium

2001 – 2002 Cours de Civilisation Française de la Sorbinne/ Paris
 2002 – 2004 Medizinstudium an der Ludwig Maximilians Universität/ München
 2004 - 2009 Klinischer Studienabschnitt an der Technischen Universität München/ Klinikum München Rechts der Isar (Abschluss: Staatsexamen bestanden am 18.06.2009)

Schulausbildung

1992 – 2001 Musisches Camerloher Gymnasium Freising
 Abschluss: Abitur

Praktisches Jahr

02/2008 – 06/ 2008 1. Terial: Wiederherstellungschirurgie – Abteilung für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie am Universitätsspital Basel, Prof.Dr.Dr. F. Zeilhofer; CH
 06/2008 – 10/2008 2. Terial: Innere Medizin at the Timisoara Institute of Cardiovascular Medicine, Prof. Dr. S. Dragulescu;

University of Medicine Victor Babes Timisoara/ RO

10/2008 – 01/2009

3. Terial: Chirurgie

Teil 1: Spitalul Judetean de Urgența, Clinica
Chirurgie Vasculara, Prof. Dr. M. Ionac; University of
Medicine Victor Babes Timisoara/ Romania

Teil 2: Canniesburn Plastic Surgery Unit, Mr. T. Shoab;
Royal Infirmary Glasgow/ UK

Stipendien

2007

Stipendium der Bayerischen Forschungsstiftung zur
Förderung der Internationalen Zusammenarbeit in der
angewandten Forschung
Projektthema: Untersuchungen in klinischer Dimension zum
chirurgischen Transfer präfabrizierter Lappen mit integriertem
Tissue Engineering Konstrukt)

2004

Stipendium der IFMSA (International Federation of Medical
Student´s Association): Research exchange Programm
(Project: Molecular Genetics of Alveolar Epithelium
Differnece) of the Fu-Jen Catholic University Taipei/ Taiwan
R.O.C

2003

Stipendium für ein Auslandssemester im Rahmen des
Mobilitäts-Programms zwischen der Universidad Miguel
Hernandez in Alicante/ ES und der LMU München