

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

**Untersuchung humaner tissue-engineerter
Knorpelkonstrukte im präfabrizierten
Durchflussmodell der Maus**

Thomas Eckhard Gehrke

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier
2. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

Die Dissertation wurde am 30.07.2012 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.04.2013
angenommen

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Allgemeiner Teil	7
2.1	Tissue Engineering	8
2.2	Tissue Engineering von Knorpelgewebe	13
2.3	Präfabrikation	17
2.4	Zielsetzung der Arbeit	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Versuchstiere	21
3.2	Knorpelgewebe	22
3.3	Zellträger	23
3.3.1	Polyurethankonstrukte	23
3.3.2	Fibrinkleber	24
3.4	Anfertigung der Konstrukte	24
3.4.1	Gewebeverdau und Zellisolierung	24
3.4.2	Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen	25
3.4.3	Aussaat in Monolayer-Kultur und Passagieren der Zellen	25
3.4.4	Einbringen der Zellen in das Konstrukt und 3-D-Kultur	26
3.5	Operationstechnik und Versuchsablauf	27
3.5.1	Operationsbedingungen und Narkose	27
3.5.2	Implantation der Konstrukte	27
3.5.3	Schwenk des Konstruktes	29
3.5.4	Explantation der Konstrukte	29
3.6	Histologische Untersuchungen	31
3.6.1	Anfertigung der Paraffinschnitte	31
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	31
3.6.3	Azan-Novum-Färbung	32
3.6.4	Alcianblau-Kernechtrot-Färbung	32
3.6.5	Safranin O/Fast Green-Färbung	33
3.7	Immunhistochemie	33
3.8	Biochemische Analysen	34
3.8.1	Vitalitätsfärbung	34

3.8.2	Papainverdau	35
3.8.3	Bestimmung des DNA-Gehalts	36
3.8.4	Bestimmung des Gehalts an Glykosaminoglykanen.....	37
3.9	Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Zellkulturen.....	39
4.2	Versuchstiere	39
4.3	Auswertung der histologischen Untersuchungen.....	40
4.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	40
4.3.2	Azan-Novum-Färbung.....	42
4.3.3	Alcianblau-Kernechtrot-Färbung	44
4.3.4	Safranin-O / Fast Green-Färbung	46
4.4	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen.....	48
4.5	Auswertung der quantitativen Analysen	49
4.5.1	Gewicht	50
4.5.2	DNA-Assay.....	51
4.5.3	GAG-Assay	52
5	Diskussion	54
5.1	Kulturbedingungen und Dreidimensionalität.....	55
5.2	Knorpel und Vaskularisierung.....	56
5.3	Knorpelqualität und vaskuläre Integration.....	58
5.4	Ausblick	63
6	Zusammenfassung.....	64
7	Literaturverzeichnis	66
8	Danksagung.....	76

1 Einleitung

Das Konzept des Tissue Engineerings besteht schon seit den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts (Bisceglie, 1933). Es beinhaltet eine interdisziplinäre Zusammenarbeit der Bereiche Zellbiologie, Zellkulturtechnik und Biomaterialentwicklung mit dem Ziel, bioartifizielle Ersatzmaterialien menschlichen Gewebes herzustellen. In den letzten 30 Jahren hat sich das Wissen auf diesem Forschungsgebiet enorm erweitert und zahlreiche neue Anwendungsmöglichkeiten wurden entwickelt (Langer, 1993, Fuchs, 2001).

Trotz des immensen Forschungsaufwandes haben bisher nur wenige Anwendungen Eingang in die klinische Praxis gefunden. Die Gründe hierfür liegen in den komplexen Anforderungen an tissue-engineerte Materialien, welche nicht nur die Morphologie, sondern vor allem auch die Funktionen gesunden Gewebes ersetzen sollen.

Eine mögliche Ursache für ein Scheitern eines Gewebeersatzes ist die Entdifferenzierung der eingebrachten Zellart, welche dadurch nicht mehr über die Charakteristika der ursprünglich gewünschten Zelllinie verfügt und somit deren Funktionen auch nicht übernehmen kann.

Ebenfalls zu verhindern ist eine eventuelle Immunreaktion des Wirtskörpers auf die eingebrachten Konstrukte, was zum Untergang des gezüchteten Gewebes führen kann (Langer, 1993).

Und schließlich ist es für die Integration komplexerer Konstrukte notwendig, dem tissue-engineerten Gewebeverband einen Anschluss an das Gefäßsystem zu ermöglichen, denn nur durch diese Vaskularisation kann das Konstrukt sämtliche funktionellen Anforderungen auch erfüllen (Grikscheit, 2002).

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass mit Chondrozyten besiedelte Polyurethankonstrukte bei engem Kontakt zu Gefäßen eine Neovaskularisation erfahren (Mandlik, 2008).

Um diese Vaskularisierung zu erreichen bietet sich die Präfabrikation des zu implantierenden Gewebeverbandes durch Insertion versorgender Gefäße an,

beispielsweise einer arteriovenösen Schlinge, wie es vor allem bei Hautlappentransfers schon beschrieben ist (Hoang, 2005).

Um für klinische Anwendungen in der rekonstruktiven Chirurgie relevant zu sein, muss das präfabrizierte Konstrukt jedoch in der Lage sein, eine Transposition an den Ort des Defektes unbeschadet zu überstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die bereits neovaskularisierten Knorpelkonstrukte eine solche Transposition tolerieren.

Dazu wurden mit humanen Chondrozyten beimpfte Polyurethankonstrukte um das femorale Gefäßbündel immuninkompetenter Nacktmäuse implantiert und mit einer Silikonfolie umschlossen, um ein Einsprossen von Gefäßen aus der Umgebung auszuschließen. Nach 3 Wochen, in denen in der Regel die Neovaskularisation weitestgehend abgeschlossen ist, wurde das Gefäßbündel distal des Konstruktes ligiert und das Konstrukt mit noch vorhandenem proximalen Gefäßanschluss über das Leistenband hinweg in die Bauchtasche transponiert, wo es eine bzw sechs Wochen bis zur Explantation belassen wurde. Als Kontrolle dienten auf den Gegenseite subkutan implantierte Knorpelkonstrukte ohne Gefäßanschluss. Die explantierten Konstrukte wurden histologisch, immunhistochemisch, photometrisch sowie fluorimetrisch auf den Grad der Vaskularisierung, die Zellzahl, die Vitalität und den Gehalt an Knorpelmatrix untersucht.

2 Allgemeiner Teil

Der Ersatz untergegangenen Gewebes ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Dieser Ersatz kann durch Traumata, Tumoren, entzündliche Veränderungen oder Verschleiß notwendig werden. Der Untergang von Gewebe und das Versagen ganzer Organe ist gravierend und eines der häufigsten und kostspieligsten Probleme der heutigen Gesundheitsversorgung (Langer, 1993).

Alle Versuche der Rekonstruktion dieser Gewebe oder gar von ganzen Organen bedürfen einer Ersatzstruktur. Derzeit sind im klinischen Alltag 3 verschiedene Verfahren in Gebrauch.

Zum einen werden vollständig künstliche Implantate verwendet, welche zum Beispiel bei Gelenkprothesen zum Einsatz kommen. Diese Implantate können jedoch selten sämtliche Funktionen des zu ersetzenden Gewebes übernehmen oder sogar den Zustand des umliegenden gesunden Gewebes verschlechtern (Langer, 1993).

Ein zweiter Ansatz ist die Verwendung verarbeiteter, nicht lebender Biomaterialien, aus denen beispielsweise Herzklappen bestehen können. Weiterhin bedeutend ist die Verpflanzung gesunden Gewebes desselben (autologe Transplantation) oder eines anderen Patienten (allogene Transplantation) (Vacanti, 1999). Hierbei ist jedoch die Knappheit des verfügbaren Gewebes oder der Organe der limitierende Faktor, bei seit Jahren ständig ansteigendem Bedarf. Die Übertragung artfremden lebenden Materials (xenogene Transplantation) spielt klinisch weitestgehend keine Rolle.

Eine neuere Alternative bietet das Tissue Engineering, welches einen Ersatz mit lebenden Gewebe ermöglicht, das entsprechend den individuellen Bedürfnissen des Patienten entworfen und verarbeitet werden kann und daher immer häufiger Eingang in die klinische Praxis findet (Vacanti, 1999).

2.1 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Fachgebiet und verwendet Techniken des Ingenieurwesens, der Biologie und der Medizin um biologische Ersatzmaterialien zu entwickeln, die Gewebefunktionen wiederherstellen, erhalten oder verbessern können (Vacanti, 1999). Das Konzept des Tissue Engineerings besteht darin, funktionstüchtiges Gewebe in Patienten, die einen entsprechenden Gewebsverlust erlitten haben, zu implantieren.

Die Anfänge des Tissue Engineerings können bis ins Jahr 1933 zurückverfolgt werden, als Bisceglie Tumorzellen der Maus mit einer Polymermembran umschloss und sie in die Bauchhöhle eines Schweins implantierte (Bisceglie, 1933). 1975 umhüllte Chick pankreatische Inselzellen mit einer semipermeablen Membran, um die Glukose-Steuerung von Patienten zu verbessern, die an Diabetes mellitus litten (Chick, 1975). Anfang der 80er Jahre entwarfen Yannas und Burke ein Gerüst aus Kollagengel und Glykosaminoglykanen, welches bei Verbrennungsopfern die Regeneration der Dermis steuern und fördern kann (Burke, 1981). Die Weiterentwicklungen dieser Technik und ihre Ausdehnung auf andere Gewebearten ist heute bereits Bestandteil klinischer Therapiekonzepte von Haut- oder Knorpelersatz. Der Ersatz von Gewebe stellt gewichtige Anforderungen an ein Modell, das sich klinisch etablieren will. Entscheidende Komponenten der meisten Anwendungen im Tissue Engineering sind die verwendeten Zellen, die Matrix, mit welcher die Zellen in den Empfänger eingebracht werden sowie Techniken, die Integration in das umliegende, gesunde Gewebe zu verbessern.

Am Beginn des Entwurfs tissue-engineerten Gewebes steht die Frage nach dem zu verwendenden Zelltyp. Dabei kommen ausdifferenzierte Zellen des gewünschten Zelltyps, Vorläuferzellen dieser Linie oder auch Stammzellen in Betracht, welche allesamt sowohl autologen als auch allogenen oder xenogenen Ursprungs sein können (Fuchs, 2001). Der ideale Zelltyp sollte möglichst keine Immunreaktion hervorrufen, sich stark vermehren, gut kultivierbar sowie leicht zugänglich sein und die Fähigkeit haben, sich in

möglichst viele verschiedene funktionelle Zelltypen zu differenzieren (Vacanti, 1998).

Autologe Zellen werden als körpereigen erkannt, rufen daher keine Immunreaktion hervor und kommen somit ohne eine Abgrenzung des besiedelten Konstruktes zum umliegenden Gewebe oder eine Immunsuppression aus, die bei allogenen oder xenogenen Zellen zwingend notwendig wäre und natürlich alle bekannten Komplikationen einer Immunsuppression nach sich ziehen würde, vor allem die erhöhte Infektionsgefahr (Zielinski, 2007). Daher werden sie für den klinischen Gebrauch favorisiert. Allerdings würde die Verwendung allogener beziehungsweise xenogener Zellen den Kreis verfügbarer Spender drastisch erweitern und sollte somit nicht völlig außer Acht gelassen werden. Durch die anschließend in vitro erfolgende Anzüchtung der gewonnenen Zellen ist auch eine nicht allzu große Menge Zellen oft bereits ausreichend.

Der Differenzierungsgrad der verwendeten Zellen bietet ebenfalls einige Variationsmöglichkeiten. Bereits heute befinden sich ausdifferenzierte, autologe Zellen im klinischen Gebrauch, so zum Beispiel Knorpelzellen, die in Kniegelenke eingebracht werden (Mayhew, 1998). Ausdifferenzierte Zellen sind in aller Regel gut zugänglich und benötigen kaum weitere Vorbehandlungen in vitro, da sie schon den gewünschten Zelltyp repräsentieren. Allerdings vermehren sie sich nicht so gut wie ihre Vorläuferzellen, und einige Zellarten wie Hepatozyten oder Kardiomyozyten lassen sich in vitro kaum oder überhaupt nicht kultivieren (Fuchs, 2001). Darüber hinaus sind die Regenerationsfähigkeiten ausdifferenzierter Zellen schlechter, so dass sie Stresssituationen wie eine Transplantation weniger gut tolerieren als es undifferenziertere Zellen könnten.

Aus diesem Grund rücken zunehmend Stammzellen ins Blickfeld der Forschung, da sie wesentlich schneller proliferieren als ausdifferenzierte Zellen und ein breiteres Spektrum an möglichen Einsatzgebieten besitzen (Caplan, 1991, Vacanti, 1999, Barrilleaux, 2006).

Da die Verwendung fetaler Stammzellen nicht nur strengen gesetzlichen Richtlinien und ethischen Fragestellungen unterworfen ist, sondern auch eine gezielte Ausdifferenzierung dieser in die gewünschten Zelllinien äußerst

schwierig ist, werden derzeit adulte Stammzellen bevorzugt eingesetzt (Chung, 2008). Diese besitzen klare Vorteile im Hinblick auf ihre Verfügbarkeit, rufen als in aller Regel autologe Zellen keine immunologischen Abstoßungsreaktionen hervor und sind auch leichter in eine bestimmte Zelllinie zu differenzieren (Prockop, 2003). Diese adulten Vorläuferzellen lassen sich aus einer Vielzahl von Geweben isolieren, jedoch meist in sehr geringer Anzahl, da der Anteil ausdifferenzierten Gewebes bei der Entnahme stark überwiegt. Ebenso gestaltet es sich oftmals schwierig, nach der Entnahme die benötigten Stammzellen von differenzierten Zellen zu isolieren (Barrilleaux, 2006). Am effektivsten gilt ihre Gewinnung aus Knochenmark und Fettgewebe, welches bei vielen Routineoperationen gewonnen werden kann (Zuk, 2001, Matsubara, 2005).

Dennoch bleibt auch bei diesen Vorläuferzellen die gezielte Differenzierung in die gewünschten Zellarten eine große Herausforderung (Vacanti, 1999). So bedarf auch das Milieu, in welchem die Stammzellen *in vitro* vermehrt werden sollen, noch weiterer Verbesserungen, da Untersuchungen zeigen, dass die Vermehrung *in vitro* wesentlich ineffizienter abläuft als *in vivo*, was die Ausbeute der Zellen nochmals reduziert (Digirolamo, 1999).

Nach der Entscheidung für einen bestimmten Zelltyp und dessen Kultivierung in einem speziell auf diese Zellen zugeschnittenen Medium ist die nächste Herausforderung einen Weg zu finden, wie diese Zellen in einem dreidimensionalen Gerüst funktionsfähig in den Körper eingebracht werden können (Luo, 2007). Dieses Ziel wird derzeit auf verschiedenen Wegen zu erreichen versucht: Durch die alleinige Injektion isolierter Zellen sowie durch die Verwendung von Matrizen, welche mit Zellen besiedelt wurden (Langer, 1993, Vacanti, 1999). Die Verwendung isolierter Zellen oder Zellsubstitutionen umgeht chirurgische Komplikationen und ermöglicht Modifikationen der Zellen vor der Injektion. Als Nachteile sind hier vor allem eine mögliche Abstoßungsreaktion sowie Funktionsverlust der Zellen zu nennen (Langer, 1993).

Die heute am häufigsten verwendete Methode basiert auf Zell-besiedelten, 3-dimensionalen Matrizen. Die dafür verwendeten Materialien sind entweder synthetischen oder natürlichen Ursprungs und groß genug, um eine

beträchtliche Anzahl in vitro gezüchteter Zellen aufzunehmen und dem Empfänger zu transplantieren, um dort als eine Art Schablone für die Regeneration zu dienen. Synthetische Materialien sind stabiler und lassen sich leichter im Hinblick auf Mikrostruktur, Abbaubarkeit oder Permeabilität hin entwerfen, während natürliche Komponenten die extrazelluläre Matrix besser imitieren können, was sich vor allem in den Interaktionen zwischen den Zellen positiv auswirkt (Vacanti, 1999). Daher ist eine Verbindung beider Materialeigenschaften die erstrebenswerte Lösung und Gegenstand aktueller Forschungen.

In der Anwendung befinden sich vor allem 4 Arten von verarbeiteten Materialien, die lebendes Gewebe imitieren sollen.

Der erste Weg besteht in der Verwendung von azellulären, also nicht mit Zellen besiedelten Matrizen. Diese sollen lediglich als Gerüst dienen, anhand dessen sich das vorhandene gesunde Gewebe regenerieren soll. Da hierbei keine Zellen verwendet werden entfallen deren Gewinnung und Kultivierung, allerdings ist es oft nötig Wege zu finden, wie die umgebenden Zellen für das Besiedeln der Konstrukte rekrutiert werden können, zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren oder andere Signalmoleküle (Deuel, 2007).

Eine zweite Methode benutzt Zell-Besiedelte Gele aus Kollagen, Hydroxylapatit oder Alginat und wurde erstmals Ende der siebziger Jahre entwickelt (Bell, 1979). Diese natürlichen Materialien erlauben eine hohe Interaktion mit dem umgebenden Gewebe und fördern so die Integration des Konstruktes. Neben besiedelten Kollagengelen zur Behandlung von Hautdefekten haben auch auf Alginat basierende Konstrukte teilweise Einzug in die klinische Praxis gefunden (Diamond, 1998).

Der dritte Ansatz basiert auf Zell-besiedelten Polymerkonstrukten und ist seit seiner Entwicklung zu Beginn der neunziger Jahre die am häufigsten verwendete Variante (Cima, 1991). Diese Polymere müssen gute mechanische Eigenschaften besitzen und für viele Anwendungen eine bestimmte Form und dauerhafte Struktur aufweisen, um eine gelungene Integration in gesundes Gewebe zu ermöglichen (Vacanti, 1999). Durch ihre dreidimensionale Struktur und die zahlreichen Möglichkeiten die Zusammensetzung zu variieren bieten sie ideale Bedingungen um

maßgeschneiderte Konstrukte für verschiedenste Zwecke zu entwerfen. So lassen sich zum Beispiel gezielt Parameter wie die Dauer der Resorption des Polymers, die Porosität sowie die Zug- und Druckfestigkeit paßgenau auf den Verwendungszweck zuschneiden (Guelcher, 2008). Noch wichtiger jedoch ist die Fähigkeit dieser 3-dimensionalen Konstrukte, durch ihre Porosität die Bildung vaskularisierten Gewebes zu erreichen, da Gefäße in die Konstrukte einsprossen können und somit einerseits die Versorgung des Gewebes verbessern, und andererseits helfen, das Gewebe homogen in den Körper zu integrieren (Vacanti, 1988).

Schließlich sei noch eine eher selten verwendete Methode erwähnt, darauf basierend, dass die eingebrachten Zellen ihre eigene Matrix bilden und sich somit selbst ein Gerüst schaffen, in welchem sie wachsen können (Auger, 1995).

Die Hauptprobleme des Tissue Engineerings ergeben sich aus den verwendeten Komponenten. Mit am bedeutsamsten ist die Problematik der Immunantwort des Empfängers. Diese kann sowohl durch die Zellen als auch durch die verwendete Matrix hervorgerufen werden. Umgangen werden kann dies entweder durch die Verwendung autologer Zellen sowie nicht immunogener Matrizen, oder die Abschottung des eingebrachten Konstruktes vom umgebenden Gewebe mittels einer semipermeablen Membran, welche die nutritive Versorgung sowie den Abtransport von Abbauprodukten ermöglicht, gleichzeitig jedoch für große Moleküle, wie Antikörper oder Immunzellen, undurchlässig ist und daher als geschlossenes System bezeichnet wird. Ein offenes System dagegen wird besser in den Körper integriert (Langer, 1993).

Ein weiteres Hindernis ist die oftmals auftretende Entdifferenzierung von Zellen in vitro oder anschließend in vivo, welche die teilweise oder völlige Umbildung des Gewebes zur Folge haben kann. Hier muss versucht werden, möglichst exakt die physiologischen und physikalischen Stimuli auf das Konstrukt zu übertragen, die auch auf das gewünschte Zielgewebe einwirken (Chung, 2008).

Schlussendlich ist die Integration in gesundes Gewebe, das eigentliche Ziel des Tissue Engineerings, eine eigene Problematik, da sich nur Gewebe,

welches ausreichend nutritiv versorgt wird, in einen Zellverband einfügen kann. Daher kommt der Vaskularisierung der eingebrachten Konstrukte sowie der Verwendung von Wachstumsfaktoren eine besondere Bedeutung zu (Vacanti, 1999).

2.2 Tissue Engineering von Knorpelgewebe

Die eben beschriebenen Grundgedanken des Tissue Engineerings gelten auch für die Züchtung von Knorpelgewebe. Da Knorpelgewebe über keinerlei Gefäße, Nerven oder Lymphgefäße verfügt, besitzt es von Natur aus schlechte Regenerationsfähigkeiten (Campbell, 1969), und eignet sich somit ideal für Anwendungen im Bereich des Tissue Engineerings.

Auch hier sind die entscheidenden Komponenten die Zellart, deren Kultivierungsbedingungen, die Matrix, in der sie in das vorhandene Gewebe eingebracht werden sowie eventuell die Verwendung von Wachstumsstimulanzen (Chung, 2008).

Knorpelgewebe kommt im menschlichen Körper in 3 Formen vor, als hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel sowie Faserknorpel. Da hyaliner Knorpel der vorherrschende Typ in Gelenken ist und auch seine mechanischen Eigenschaften den anderen Arten überlegen sind, konzentriert sich die Forschung auf diesen (Chung, 2008). Am häufigsten verwendet werden ausdifferenzierte Chondrozyten, die jedoch, bedingt durch die geringe Zellzahl in Knorpelgeweben, nur wenige Zellen mit einer Entnahme einbringen, und deshalb in vitro stark vermehrt werden müssen. Weil die Gewinnung von hyalinem Gelenkknorpel eine recht invasive Prozedur darstellt und mit dem Risiko behaftet ist, an der Entnahmestelle einen irreparablen Funktionsverlust zu verursachen, richtet sich das Augenmerk der Forscher zunehmend auf andere Quellen von Knorpel im Körper, vor allem aurikulärem, costalem und nasoseptalem Ursprungs, die außerdem eine höhere Proliferationskapazität besitzen und somit leichter zu expandieren sind (Kafienah, 2002b). Leider zeigen ausdifferenzierte hyaline Knorpelzellen eine starke Tendenz zu Entdifferenzierung und einer generellen Verschlechterung der Gewebequalität; so wird nach der Expansion vermehrt Kollagen vom Typ I,

wie er in Faserknorpel vorkommt, statt Typ II sezerniert, und der Gehalt an Proteoglykanen nimmt ebenfalls ab (Chung, 2006, Goessler, 2006a).

Einen weiteren, wenig invasiv zu gewinnenden Zelltyp stellen Fibroblasten da, die zahlreich in der Haut vorkommen. Im Gegensatz zu Chondrozyten müssen sie jedoch erst in Richtung des chondrozytären Phenotyps differenziert werden, was in einer Kultur auf Aggrecan, unter Zugabe von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), gelingen kann (French, 2004).

Durch die Verbesserungen der Kulturbedingungen rücken auch beim Tissue Engineering von Knorpel Stammzellen mehr und mehr in den Vordergrund. Da auch hier die Gewinnung möglichst einfach von statten gehen soll, haben sich vor allem Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe bewährt. Durch Punktion des Knochenmarks werden bone marrow-derived stem cells (BMSC) in akzeptabler Zahl gewonnen, ihre Differenzierung zu Chondrozyten gelingt durch eine drei-dimensionale Kulturmgebung und der Verwendung von TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) (Coleman, 2007). Jedoch erweisen sich sowohl die Menge an sezernierter Matrix als auch die mechanischen Eigenschaften der so gezüchteten Chondrozyten nicht als optimal (Mauck, 2006).

Aus Fettgewebe können hingegen adipose-derived stem cells (ADSC) isoliert werden, welche mesenchymalen Ursprungs sind und sich ebenfalls in Chondrozyten differenzieren lassen. Dafür benötigen sie den Zusatz von TGF- β , Ascorbinsäure und Dexamethason in einer drei-dimensionalen Kulturmgebung (Zuk, 2001, Zuk, 2002). Allerdings ist das chondrogene Potenzial dem der BMSC's unterlegen, was sich insbesondere in der Zusammensetzung des Kollagens und der Matrixproteine äußert (Huang, 2005).

Embryonale Stammzellen hingegen stammen aus der inneren Zellmasse des embryonalen Blastozystenstadiums. Sie lassen sich sehr oft teilen und potenziell in alle somatischen Zelllinien differenzieren. Auch wenn die Differenzierung zu Chondrozyten bereits gelang (Hwang, 2006), steht der Aufwand bislang noch in keinem vernünftigen Verhältnis zum Ertrag,

weswegen embryonale Stammzellen bislang für die Chondrogenese nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Gerade bei der Herstellung von Knorpelgewebe ist eine drei-dimensionale Gerüststruktur wichtig. Dabei sollte das zu verwendende Gerüst kontrolliert abbaubar sein, die Vitalität und die Differenzierung der Zellen sowie die Produktion der extrazellulären Matrix fördern, die Diffusion von Nährstoffen und Abbauprodukten zulassen, sich gut in das umliegende Gewebe integrieren sowie den entsprechenden Defekt sowohl in seiner Größe als auch in seinen mechanischen Belastungen möglichst vollständig ersetzen können (Chung, 2008). Die meisten Konstrukte bestehen aus Polymeren, welche entweder natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Natürliche Polymere wie Fibrinkleber (Eyrich, 2007a) oder Kollagen (De Franceschi, 2005) ermöglichen eine hohe Zell-Konstrukt-Interaktion und unterstützen so das Zell- und Matrixwachstum erheblich, durch ihren natürlichen Ursprung besteht allerdings ebenso das Risiko einer Immunreaktion. Diese tritt bei synthetischen Polymeren wie Poly-ethylenglycol (PEG) (Bryant, 2004) oder Poly-urethanen (Grad, 2003) so gut wie nicht auf. Ebenso sind synthetische Polymere besser auf verschiedene Anforderungen hin herstellbar. Dafür gibt es keine echte Interaktion zwischen Zellen und Konstrukt, was dem Zellwachstum abträglich ist.

Auch die Form, in welcher diese Polymere zusammengesetzt werden, variiert stark. Verwendet werden sie in Form von Hydrogelen, Schwämmen (Sponges) oder Netzgerüsten (Meshes).

Hydrogele sind stark wasserhaltige, aber gleichzeitig wasserunlösliche Polymere, deren Moleküle chemisch oder physikalisch verbunden sein können. Da sie die Versorgung mit Nährstoffen und eine gleichmäßige Verteilung von Zellen ermöglichen, sowie auch mechanische Impulse weiterleiten können, sind sie als Gerüst für einzubringende Zellen gut geeignet. Darüber hinaus lassen sie sich durch ihre Beschaffenheit sogar durch Injektion einbringen (Chung, 2008). Hydrogele können aus einer Vielzahl an Polymeren hergestellt werden, unter anderem mit PEG oder Kollagen (Bryant, 2002, De Franceschi, 2005). Leider sind die

Materialeigenschaften nicht so frei bestimmbar wie bei anderen Konstruktarten, und die drei-dimensionale Struktur ist mechanisch nicht sehr stabil (Bryant, 2002).

Schwämme sind stark poröse Konstrukte, deren Eigenschaften von den Faktoren Porengröße, Porosität und Interkonnektivität abhängen. Dabei bestimmt die Porosität die Oberfläche, die für die Zelladhäsion zur Verfügung steht, während Porengröße und Interkonnektivität die Einwanderung, Verteilung und Matrixproduktion der Zellen beeinflusst (Bhardwaj, 2001). Um diese Materialeigenschaften zu erreichen bedient man sich verschiedenster Fertigungsmethode wie zum Beispiel Gefriertrocknung, Gasschäumung oder porogener Laugung. Auch bei den Schwämmen stehen zahlreiche Materialien zur Verfügung, so werden sie beispielsweise aus poly- α -hydroxyl-Estern (Chen, 2004) oder Hyaluronsäure (Solchaga, 2005) hergestellt.

Eine dritte Variante für Matrizen ist die Verwendung von Netzwerken aus Fasern. Der Durchmesser und die Richtung der Fasern sowie deren Abstand bestimmen weitestgehend das Verhalten der eingebrachten Zellen. Netzwerke aus gewobenen Fasern besitzen eine größere Festigkeit und lassen sich leichter anpassen, während nicht-gewobene Fasern ein größeres Volumen und eine größere Oberfläche einräumen und somit die Zelladhäsion erleichtern (Chung, 2008). Wie bei Hydrogelen und Schwämmen gibt es auch für Netze eine große Anzahl verfügbarer Materialien. Am häufigsten Verwendung finden hierbei poly- α -hydroxyl-Ester wie Poly-lacton, Polyglycolid (Chung, 2008) oder Poly-caprolacton (Guelcher, 2008).

Chondrozyten tendieren sowohl während der *in vitro* Vermehrung als auch *in vivo* dazu, sich zu entdifferenzieren. Deshalb ist es gerade beim Tissue Engineering von Knorpelgewebe oftmals nötig, das Milieu des Kulturmediums sowie die Bedingungen *in vivo* so anzupassen, dass die natürliche Umgebung des Knorpels möglichst gut simuliert werden kann. Hervorzuheben ist hier sicherlich die Verwendung von Wachstumsfaktoren.

Vor allem TGF- β unterstützt sowohl die Differenzierung von Stammzellen zu Chondrozyten als auch die Proliferation von Chondrozyten selbst (Rosier, 1989). Aber auch andere Substanzen wie FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2)

und IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) oder Insulin werden verwendet um das Wachstum der Chondrozyten zu verbessern (Kellner, 2001, Veilleux, 2005). Es ist sogar möglich diese Wachstumsfaktoren mittels einer gesteuerten Freisetzung aus der Matrix in vivo zu applizieren.

Und schließlich ist natürliches Knorpelgewebe im Körper mechanischen Belastungen ausgesetzt, die ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung des Gewebes haben. Daher sollte versucht werden, möglichst genau neben den physiologischen auch die mechanischen Stimuli nachzuahmen, wie es derzeit entweder durch hydrostatischen Druck (Scherer, 2004) oder dynamische Kompression zu erreichen versucht wird (Waldman, 2006).

2.3 Präfabrikation

Das Problem der nutritiven Versorgung transplantierte Gewebeverbände ist in der rekonstruktiven Chirurgie von entscheidender Bedeutung. Nur wenn das implantierte Gewebe einen dauerhaften Anschluss an den Blutkreislauf findet hat es die Möglichkeit, eine Integration in umliegendes Gewebe zu erfahren.

Klinisch relevant sind in der rekonstruktiven Chirurgie derzeit vor allem Lappenplastiken zur Defektdeckung nach Traumata oder Tumoren (Germann, 1998). Freie Hautlappen aus Hautarealen bieten eine gute Möglichkeit zur Deckung oberflächlicher Defekte, müssen aber, da sie morphologisch und funktionell dem zu ersetzenden Gebiet möglichst gut entsprechen sollen, meist aus der näheren Umgebung rekrutiert werden. Gestielte Lappen sind kombinierte Konstrukte aus Haut und Muskelfaszie, die mit dem sie versorgenden Gefäßstiel in das Defektareal geschwenkt werden. Sie ermöglichen so zwar eine Deckung auch tiefergehender Defekte und sind nutritiv durchgehend gut versorgt, sind aber in ihrer Auswahl beschränkt, da durch die begrenzte Länge des Gefäßstieles nur bestimmte Faszienlappen in der Umgebung chirurgisch realisierbar sind. Für Transpositionen über größere Entfernungen hat ein mikrochirurgischer Anschluss eines gefäßführenden Transponates an ein bestehendes Gefäß des Defektareals zu erfolgen (Germann, 1998).

Bei großen Defekten, oder falls keine andere Lappenplastik realisierbar ist, bietet seit einigen Jahren die Präfabrikation einen neuen therapeutischen Ansatz, in deren Rahmen das Transponat durch Veränderungen vor der Verpflanzung speziell an die Anforderungen der Empfängerstelle angepasst wird. Dies ermöglicht die Schaffung von Lappen, die vorher in dieser Form im Körper nicht existierten und erweitert das Spektrum der Wiederherstellungschirurgie enorm (Abbase, 1995).

Grundsätzlich lassen sich 3 Formen präfabrizierter Lappen unterscheiden.

Die erste Form die eingesetzt wurde bestand aus einer definierten Hebestelle, welche im Rahmen der Präfabrikation eine Vergrößerung erfuhr oder durch Lappenumschneidung, Vorformung oder Implantation autologen oder xenogenen Materials verändert wurde.

Als nächstes entwickelte man Neolappenplastiken, eine Komposition von ausgewähltem Hautareal und gefäßtragendem Modul, die in dieser Form bis dahin nicht im Körper bestand. Das gefäßtragende Modul kann eine arteriovenöse Schlinge sein, die unter das Hautareal eingefügt wird und so eine definierte Versorgung des Gewebes ermöglicht. Oder es wird ein bekannter Faszienlappen unter die Dermis des Spenderareals gelegt, um so einen fasziokutanen Lappen zu erzeugen. Beide Varianten können nach Einheilung und ausreichender Neovaskularisation am Spenderort mikrochirurgisch an den Ort des Defektes verpflanzt werden (Khoury, 1992). Dabei wird in der klinischen Praxis der fasziokutane Lappen derzeit bevorzugt, da bei der Verwendung einer reinen arteriovenösen Schlinge eine Tendenz zur venösen Stauung und einer Lappenspitzennekrose besteht (Morrison, 1997).

Die dritte Variante präfabrizierter Lappen besteht in einer Kombination der beiden vorherigen Formen, in der ein fasziokutaner Lappen mittels eines Expanders vergrößert wird. Dadurch erhöht sich das Einsatzgebiet dieser Art der Lappenplastik noch einmal beträchtlich (Khoury, 1995).

In jüngster Zeit wurden diese Techniken auch auf Anwendungsbereiche des Tissue Engineerings übertragen und mit diesen kombiniert. Eine Möglichkeit besteht in der Implantation gezüchteter Zell-Biomaterialkonstrukte in einen bereits präfabrizierten Lappen, wie dies für Knorpelzellen in Kaninchen bereits

untersucht wurde (Hoang, 2009). Ein anderer Weg, welcher auch in der hier vorliegenden Studie verfolgt wurde, ist die direkte Implantation eines Gefäßstiels in ein tissue-engineertes Konstrukt, um hier durch den Kontakt von Gefäßen zu Zell-besiedeltem Biomaterial eine Integration in das umliegende Gewebe zu erhalten (Mandlik, 2008).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Verbesserung des Tissue Engineerings von Knorpelgewebe zu leisten, insbesondere die Vaskularisierung drei-dimensionaler Knorpelkonstrukte betreffend.

Dazu wurde humanes Knorpelgewebe nasoseptalen Ursprungs, welches bei Routineoperationen anfiel, in vitro aufbereitet und vermehrt. Anschliessend wurden münzförmige Polyurethan-Schwämme (Durchmesser 5 mm, Höhe 2 mm) mit jeweils 1 Million Chondrozyten beimpft. Diese beimpften Knorpelkonstrukte wurden nun, nach einer seitlichen Inzision bis zur Hälfte der Konstrukte, um die freipräparierten Femoralgefäße immuninkompetenter Nacktmäuse gelegt, sodass die arteriellen und venösen Gefäße direkt durch die Mitte der Konstrukte verliefen und somit die Möglichkeit hatten, in das Konstrukt einzusprossen. Um ausschließlich das Aussprossen von Gefäßen aus dem implantierten Gefäßbündel und nicht aus der Umgebung aufzuzeigen, wurden die Konstrukte mit einer Silikonfolie umschlossen. Als Kontrolle wurden auf der Gegenseite identisch behandelte Konstrukte subkutan ohne Gefäßanschluß implantiert. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass die Neovaskularisierung durchschnittlich nach 3 Wochen vollzogen ist (Staudenmaier, 2004a, Nguyen, 2005). Nach 3 Wochen wurde das Gefäßbündel distal der Konstrukte ligiert und die Konstrukte über das Leistenband hinweg in eine Bauchtasche geschwenkt, wo es in Gruppe 1 eine Woche verblieb. In Gruppe 2 wurde es 6 Wochen dort belassen. Ebenfalls in Vorversuchen wurde kein signifikanter Unterschied in der Neovaskularisierung der Knorpelkonstrukte gefunden bei Verwendung eines Durchflußgefäßes, wie es bis zur Transposition bestand, oder eines Ligaturgefäßes, zu dem es nach der Transposition wurde (Mandlik, 2008).

Nach Ablauf der für die beiden Gruppen entsprechenden Zeit wurden die Konstrukte gehoben. 10 Konstrukte in jeder Gruppe wurden anschließend mit Paraffin fixiert und in 7µm dicke Schnitte geteilt. Diese Schnitte wurden daraufhin histologisch und immunhistochemisch gefärbt und auf ihre Vaskularisierung, Knorpeldichte und Knorpelqualität hin untersucht. An 7 weiteren Konstrukte jeder Gruppe wurde dagegen der Gehalt an DNA und Glykosaminoglykanen fluoreszenzspektrometrisch bzw spektralphotometrisch bestimmt. Dies ermöglicht eine breite Abdeckung der am häufigsten verwendeten Untersuchungsmethoden tissue-engineerten Knorpelgewebes.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen 6 Wochen alte weibliche NMRI-Foxn1 nu/nu Mäuse (Charles River, Sulzfeld, D).

Diese spezielle Mauszüchtung ist von Geburt an nackt, der Thymus bleibt zeitlebens klein und zystisch. Der daraus folgende T-Zellmangel bietet die ideale Grundlage für Versuche mit Tumorinjektionen und xenogenen Transplantaten wie den unseren, da man sicher sein kann, dass es nicht zu Abstoßungsreaktionen gegen das eingebrachte Material kommt.

Der kongenitale Thymusdefekt führt zu einigen Störungen innerhalb des Immunsystems der Maus. So kommt es zu einer Entleerung der Lymphozyten aus thymusabhängigen Organen wie Lymphknoten und Milz. Die Lymphozytenzahl ist allgemein reduziert, und die Lymphozytenpopulation besteht fast ausschließlich aus B-Lymphozyten (Rygaard, 1973). Während die Mäuse über eine relativ normale IgM-Antwort auf Thymus-unabhängige Antigene verfügen, ist die Immunantwort auf Thymus-abhängige Antigene äußerst schlecht. Daraus folgt unmittelbar die Unfähigkeit, allogene und xenogene Transplantate abzustossen, sowie eine immense Infektanfälligkeit (Gershwin, 1975).

Die Zahl natürlicher Killerzellen sowie lymphokine activated killer cells (LAK) ist bei diesen Mäusen höher als bei nicht immundefizienten Tieren, und ihre Aktivität ist erhöht, wahrscheinlich als Versuch einer Kompensation des T-Zelldefektes (Hasui, 1989).

Mononukleäre Zellen sind ebenso in normaler Zahl vorhanden, die Makrophagenfunktion erscheint leicht verbessert (Cheers, 1975), was auf deren Unabhängigkeit von der T-Zellfunktion schließen lässt (Rao, 1977).

Die Zahl der Mastzellen in Haut und lymphatischen Geweben ist mit der nicht immundefizienter Tiere vergleichbar, und auch ihre Funktion ist unbeeinträchtigt (Wlodarski, 1982). Diese Eigenschaften machen NMRI-

Foxn1 nu/nu Nacktmäuse zu idealen Versuchstieren für die Transplantation humaner Knorpelkonstrukte, wie es diese Arbeit zum Ziel hat.

Die Mäuse wurden in Gruppen von bis zu 10 Tieren in einem durchsichtigen Polykarbonkäfig (Makrolon®, W. Ehret, Emmendingen, D) der Größe 30 cm x 35 cm x 15 cm auf staubfreiem Weichholzgranulat (Ssniff, W.Ehret, Emmendingen, D) gehalten. Die Umweltbedingungen der Mäuse wurden bei $26 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur sowie $60 \pm 5 \%$ relativer Luftfeuchtigkeit konstant gehalten. Licht erhielten die Käfige täglich von 7.00 bis 19.00 Uhr. Die Nahrung der Tiere bestand ausschließlich aus pelletierter, autoklavierter Alleindiät (Ssniff, W. Ehret, Emmendingen, D) und sterilem Leitungswasser aus Flaschen ad libidum. Die Mäuse wurden ständig räumlich getrennt von den übrigen Versuchstieren gehalten.

3.2 Knorpelgewebe

Knorpel ist eine spezialisierte Form von Bindegewebe, das mechanischen Belastungen standhalten kann, ohne dabei dauerhaft verformt zu werden. Knorpel überzieht die Gelenkflächen in den Gelenken, ist bei Entwicklung und Wachstum von Knochen unentbehrlich und besitzt eine Stützfunktion in Nase, Ohr, Kehlkopf, Luftröhre und Bronchien. Auch Menisken und Zwischenwirbelscheiben bestehen aus Knorpel.

Knorpel besteht aus Zellen, den Chondrozyten, sowie reichlich extrazellulärer Matrix aus Fasern und Grundsubstanz. Die Chondrozyten sind in der von ihnen gebildeten extrazellulären Matrix eingebettet und befinden sich dort in sogenannten Lakunen. Die wichtigsten Makromoleküle der Knorpelmatrix stellen Kollagen, Hyaluronsäure, Proteoglykane und Glykoproteine dar, bei elastischem Knorpel auch Elastin (Junqueira, 2005).

Am häufigsten findet sich im Körper hyaliner Knorpel. Beim Erwachsenen findet man hyalinen Knorpel auf den Knochenoberflächen in Gelenken, in den Wänden von Nase, Larynx, Trachea und Bronchien, in den vorderen Anteilen der Rippen sowie in den Epiphysenfugen während des Wachstums. Die Matrix hyalinen Knorpels besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II und Proteoglykanen (Junqueira, 2005).

Alle Knorpelformen verfügen weder über eine Gefäßversorgung noch über Lymphgefäße, und sind nicht innerviert. Versorgt wird der Knorpel ausschließlich durch Diffusion von Kapillaren des umliegenden Bindegewebes, des Perichondriums, oder über die Synovialflüssigkeit der Gelenkhöhlen (Junqueira, 2005).

Für diese Arbeit wurde humanes, hyalines Knorpelgewebe verwendet, welches bei Routineoperationen an den Nasenscheidewänden ansonsten gesunder Patienten anfiel. Es wurde ausschließlich Knorpel verwendet, der nach der Operation verworfen worden wäre. Die Patienten waren zwischen 8 und 40 Jahren alt, womit eine bereits vorhandene Altersdegeneration der Chondrozyten weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

3.3 Zellträger

Als Gerüst für die zu implantierenden Zellen wurde ein drei-dimensionaler Polyurethanschwamm mit einem hydrogelartigen Fibrinkleber kombiniert, was schon in Vorversuchen die Zellbesiedlung deutlich verbesserte (Eyrich, 2007b).

3.3.1 Polyurethankonstrukte

Die verwendeten Polyurethankonstrukte basierten auf Polycaprolacton und wurden von der Firma Polymaterials (Kaufbeuren) zur Verfügung gestellt.

Dabei handelt es sich um Verbindungen aus PCL-diol, PCL-triol, Dextrose und Methylal, welche in einer Silikonform zwei Stunden auf 67° Celsius erhitzt werden. Anschließend werden die Konstrukte eine Stunde in kochendem, destilliertem Wasser gewaschen und 24 Stunden Vakuum-getrocknet. In münzförmige Stücke von 2 mm Höhe und 5 mm Durchmesser gestanzt werden sie daraufhin in 70 %igem Ethanol vorbehandelt und dann in einer PBS-haltigen Phiole autoklaviert. Das Volumen der Konstrukte wurde mit 40 µl bestimmt. Die durchschnittliche Porengröße betrug zwischen 100 und 250 µm, die Porosität lag bei 75 – 85% (Eyrich, 2007a).

Sämtliche Konstrukte wurden steril verpackt angeliefert und stets gemäß standardisierten Laborbedingungen unter einem Laminar Air Flow (Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific, Bonn, D) verwendet.



Abbildung 1: Polyurethanschaumkonstrukt, noch unbesiedelt.

3.3.2 Fibrinkleber

Bei einem Konstruktvolumen von 40 μl bestand der Fibrinkleber aus jeweils 20 μl Fibrinogen- und Thrombinlösung. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich weitgehend an den Arbeiten von Eyrich (Eyrich, 2007a, Eyrich, 2007b). Für die Thrombinlösung wurden 500 U/ml Thrombin im Verhältnis 1:100 mit 40 mM CaCl_2 verdünnt, so dass sich eine Konzentration von 5 U/ml ergab (Tissucol Kit, Baxter, Unterschleißheim, D). Die Fibrinogenlösung bestand aus 100 mg/ml bovinem Fibrinogen (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) aufgelöst in 10000 KIE/ml Aprotininlösung (Trasylol, Bayer, Leverkusen, D).

3.4 Anfertigung der Konstrukte

3.4.1 Gewebeverdau und Zellisolierung

Das Knorpelgewebe, das bei den genannten Septumplastiken anfiel, wurde bis zu seiner Verwendung spätestens am nächsten Tag steril bei 8 °C in DMEM (Biochrom AG, Berlin, D) gelagert, welches mit 10 % fötalem Kälberserum (Gibco, Karlsruhe, D), 3000 U/ml Penizillin sowie 3 mg/ml Streptomycin (PenStrep, Gibco, Karlsruhe, D) versetzt wurde. Außerdem wurden 20 $\mu\text{g/ml}$ Insulin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D), 50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und 0,4 mM Prolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) zugegeben, um bessere Wachstumsbedingungen zu schaffen. Unter einem Laminar Air Flow (Herasafe KS, Thermo Fisher

Scientific, Bonn, D) wurde es dann mit PBS-Puffer (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gewaschen, welcher aus 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ und 0,24 g KH₂PO₄ gelöst in einem Liter destilliertem Wasser besteht. Anschließend wurden die Knorpelstücke mit Pinzette und Skalpell von Geweberesten gesäubert und zerkleinert auf etwa 1 mm³ große Stücke, deren Gewicht bestimmt wurde. Der so zerkleinerte Knorpel wurde daraufhin in einem Verdaugefäß mit 1,5 ml einer 3 mg/ml Kollagenaselösung (Serva GmbH, Heidelberg, D) und 1,5 ml Medium je Gramm Knorpel versetzt und für 12 Stunden im Brutschrank (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Bonn, D) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % H₂O-Sättigung belassen. Nach Ablauf der 12 Stunden wurde die Verdauung mit einer Pipette entnommen, in ein handelsübliches Falcon-Röhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One, Essen, D) überführt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 2000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in Vollmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellzahl sowie die Vitalität bestimmt und dementsprechend in Zellkulturflaschen zur Monolayerkultur ausgesät.

3.4.2 Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen

Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblaumethode bestimmt. Dabei dringt eine wässrige 0,4 %ige Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in membrangeschädigte oder avitale Zellen ein und färbt sie blau, vitale Zellen werden hingegen nicht angefärbt. Im Verhältnis 1:1 wurden Trypanblaulösung und Zellsuspension gemischt und 10 µl davon in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Diese wurde nun unter dem Mikroskop (DMIL, Leica, Wetzlar, D) ausgezählt. Dabei wurde aus 4 ausgezählten Quadraten ein Mittelwert ermittelt und mit 10⁴ multipliziert, um die Anzahl der Zellen je ml zu errechnen. Durch Multiplikation mit dem Volumen der Zellsuspension erhielt man anschließend die Gesamtzellzahl.

3.4.3 Aussaat in Monolayer-Kultur und Passagieren der Zellen

Die in frischem Medium resuspendierten Zellen wurden nach der Zellzahlbestimmung nun je 0,5 g Ausgangsknorpel in einer Zellkulturflasche

(Sarstedt, Nümbrecht, D) mit 75 cm² Grundfläche ausgesät. Das Zellkulturmedium, welches alle 3 bis 4 Tage gewechselt wurde, bestand aus DMEM (Biochrom KG, Berlin, D), zusätzlich wurden 10 % fetales Kälberserum (Gibco, Karlsruhe, D), 3000 U/ml Penicillin und 3 mg/ml Streptomycin (Penstrep, Gibco, Karlsruhe, D) zugegeben. Auch hier wurden wieder 20 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D), 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und 0,4 mM Prolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) hinzugesetzt. Die Zellkulturflaschen wurden in einem Brutschrank (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Bonn, D) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Wasserdampfsättigung inkubiert. Nach ca. 2 Wochen in Kultur beginnen die Zellen zu konfluieren. Nun wurde das Medium abgegossen und die Zellkulturflasche mit PBS (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 3 ml einer 0,05 %igen Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, D) abgelöst. Die erfolgte Ablösung wurde nach 10 Minuten Inkubationszeit mikroskopisch kontrolliert. Der Zellkulturflasche wurden nun 6 ml Medium hinzugegeben, um das Trypsin zu antagonisieren, und die Zellsuspension anschließend in einem Falconröhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One, Essen, D) bei 2000 upm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde wie bereits beschrieben mit Vollmedium resuspendiert, erneut Anzahl und Vitalität mit der Trypanblaumethode überprüft. Die Zellsuspension wurde nun auf 3 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, D) mit 75 cm² verteilt und mit Medium aufgefüllt, um die Zellausbeute zu erhöhen. Insgesamt wurden für jede Knorpelprobe, die bei den Septumplastiken anfiel, 2 dieser sogenannten Passagen durchgeführt.

3.4.4 Einbringen der Zellen in das Konstrukt und 3-D-Kultur

Nach Ende der zweiten Passagezeit wurden erneut Zellzahl und Vitalität bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Entsprechend dem Ergebnis der Zellzählung wurden nun 1 x 10⁶ Zellen in 20 µl Fibrinogenlösung und 20 µl Thrombinlösung suspendiert (siehe 3.3.2) und die Polyurethankonstrukte damit beimpft. Anschließend wurden die beimpften Konstrukte für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, um dem Fibrinkleber das Aushärten zu ermöglichen. Danach wurden die nun mit Chondrozyten

besiedelten Konstrukte erneut in Vollmedium eingebracht und unter den bereits erwähnten Kulturbedingungen im Brutschrank noch eine Woche belassen, ehe sie den Versuchstieren implantiert wurden.

3.5 Operationstechnik und Versuchsablauf

3.5.1 Operationsbedingungen und Narkose

Nach einer Woche in stationärer 3-D-Kultur wurden die besiedelten Konstrukte in die Versuchstiere implantiert. Die Operationen wurden unter sterilen Bedingungen nach üblichen Richtlinien durchgeführt.

Die Narkose der Versuchstiere wurde mit einer Kombinationsanästhesie nach dem MMF-Schema, bestehend aus 7,14 mg/kg KG Midazolam (Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, D), 0,714 mg/kg KG Medetomidin (Pfizer AG, Karlsruhe, D) und 0,07 mg/kg KG Fentanyl (Janssen-Cilag AG, Neuss, D), durchgeführt.

Nach Eintritt der Narkose erfolgte eine Wischdesinfektion der Haut, die Tiere wurden auf dem Rücken liegend operiert, die Beine wurden seitlich mit Steristrips fixiert um einen Zugang zu den Femoralgefäßen zu ermöglichen. Nach erfolgter Operation wurde die Narkose mit einer Kombination aus 3,57 mg/kg KG Atipamezol (Pfizer AG, Karlsruhe, D), 0,714 mg/kg KG Flumazenil (Hoffman-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, D) und 1,7 mg/kg KG Naloxon (Pharmaselect, Ladenburg, D) antagonisiert und die Tiere nach kurzer Beobachtungszeit wieder in den Tierstall verbracht.

3.5.2 Implantation der Konstrukte

Nach erfolgter Narkose wurde eine 1,5 cm lange Hautinzision parallel zu dem durch die Haut sichtbaren femoralen Gefäßbündel (bestehend aus 2 Arterien und einer Vene) durchgeführt. Die Gefäße wurden sorgfältig von den umliegenden bindegewebigen Faszien getrennt, anschließend wurde vorsichtig der Femoralnerv vom Gefäßbündel abpräpariert. Die Konstrukte wurden daraufhin seitlich bis zur Hälfte des Durchmessers inzidiert und um das femorale Gefäßbündel gelegt, welches nun durch die Mitte des Konstruktes verlief.

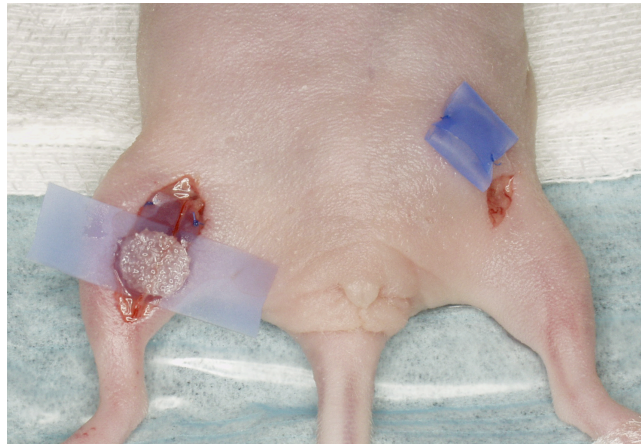


Abbildung 2: Implantation der besiedelten Polyurethankonstrukte. Hier verlaufen die Femoralgefäße der Maus bereits mitten durch das Konstrukt. Auf der Gegenseite befindet sich die Kontrolle bereits in der Silikonfolie und wird subkutan implantiert.

Um das Konstrukt wurde nun eine Silikonfolie geschlungen und mit Einzelknopfnähten vernäht, so dass sie auch bei heftigen Bewegungen der Maus das Konstrukt fest umschloss.

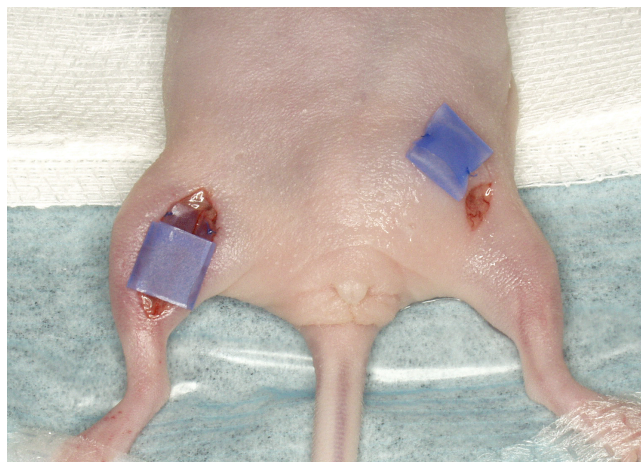


Abbildung 3: Das Konstrukt mit Gefäßanschluss befindet sich nun ebenfalls in der Silikonfolie. Nun erfolgt der Wundverschluss.

Die Wunde wurde anschließend mit einer fortlaufenden Naht vernäht. Auf der Gegenseite wurde eine Hautinzision auf Höhe des Leistenbandes der Tiere durchgeführt und eine subkutane Tasche präpariert, in die Kontrollkonstrukte implantiert wurden. Diese Kontrollen verfügten über keinen Kontakt zu Gefäßen, wurden aber ebenso mit einer Silikonfolie umschlungen und mit fortlaufender Naht verschlossen. Anschließend erfolgte die Antagonisierung der Narkose.

3.5.3 Schwenk des Konstruktes

3 Wochen nach der Implantation erfolgte die zweite Operation. Nach erfolgter Narkose wurde auf der Seite des Konstruktes mit Gefäßanschluss eine 2 cm lange Hautinzision an selber Stelle durchgeführt, diesmal bis zum Leistenband. Das Konstrukt und das Gefäßbündel wurden von bindegewebigen Septen befreit und mobilisiert, außerdem wurde proximal des Leistenbandes eine subkutane Tasche frei präpariert, in welcher das Konstrukt zu liegen kommen sollte. Anschließend wurde das femorale Gefäßbündel distal des Konstruktes ligiert und das Konstrukt mit anhängender Gefäßversorgung über das Leistenband in die subkutane Tasche geschwenkt. Das subkutane Fettgewebe wurde mittels Einzelknopfnähten so vernäht, dass das Konstrukt auch bei starken Bewegung am Ort verblieb. Die Hautnaht erfolgte wiederum in fortlaufender Naht.

Die Kontrolle auf der Gegenseite blieb unberührt. Anschließend erfolgte die Antagonisierung der Narkose.

3.5.4 Explantation der Konstrukte

Je nach Gruppenzuteilung erfolgte die Explantation eine Woche nach dem Schwenk der Konstrukte in Gruppe 1 bzw. 6 Wochen danach in Gruppe 2. Konstrukte mit Gefäßanschluß wurden zeitgleich mit den Kontrollen explantiert.

Nach erfolgter Narkose wurde beidseitig auf Höhe des Leistenbandes die Haut inzidiert, die Konstrukte mitsamt Silikonfolie gehoben und mit einem

Skalpelli von Blut und Bindegewebe gereinigt. Anschließend wurde die Silikonfolie entfernt.

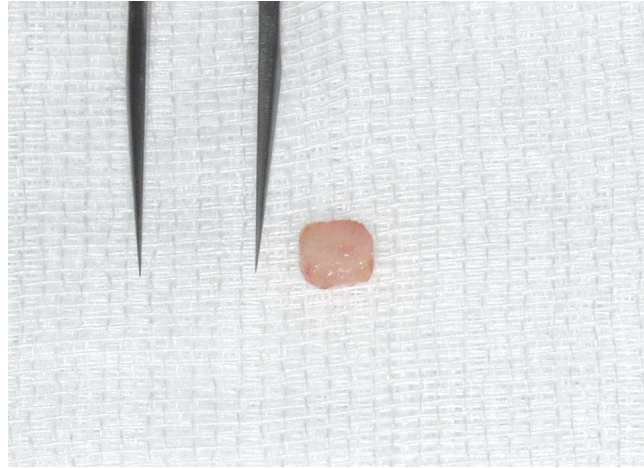


Abbildung 4: Explantiertes Konstrukt nach 9 Wochen. Es erfolgte bereits die Reinigung von Blut und Bindegewebe.

Nach Explantation wurden die Versuchstiere noch in Narkose durch zervikale Dislokation geopfert.

Die Konstrukte von 10 Tieren jeder Gruppe, die für die histologische Aufarbeitung vorgesehen waren, wurden umgehend weiter bearbeitet (siehe 3.7./3.8.)

Die Konstrukte von 7 weiteren Tieren jeder Gruppe, die für die biochemischen Untersuchungen verwendet werden sollten, wurden sofort nach Explantation unter sterilen Bedingungen gewogen (Sartorius Pro 32/34 F Waage, Sartorius, Goettingen, D). Anschließend wurde das Konstrukt mit einem Skalpell halbiert, wobei auch die beiden Hälften jeweils gewogen wurden, um eine exakte Mengenbestimmung zu erhalten. Eine Hälfte wurde unmittelbar im Anschluss für die Vitalitätsbestimmung verwendet (siehe 3.9.1.). Die andere Hälfte wurde bis zur weiteren Verwendung (siehe 3.9.2.) ohne weitere Zusätze in Polypropylenröhrchen bei -30 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Untersuchungsgruppen. Die Kontrollen stammten immer von denselben Tieren wie die Konstrukte mit Gefäßanschluss.

	Histologische Untersuchungen	Biochemische Analysen
Gruppe 1 Explantation 1 Woche nach Transposition	10 Konstrukte mit Gefäßanschluss	7 Konstrukte mit Gefäßanschluss
	10 Kontrollen	7 Kontrollen
Gruppe 2 Explantation 6 Wochen nach Transposition	10 Konstrukte mit Gefäßanschluss	7 Konstrukte mit Gefäßanschluss
	10 Kontrollen	7 Kontrollen

3.6 Histologische Untersuchungen

3.6.1 Anfertigung der Paraffinschnitte

Die Konstrukte von jeweils 10 Tieren beider Gruppen wurden zur Anfertigung von Paraffinschnitten verwendet. Dazu wurden sie über Nacht in einer 4 %igen Formalinlösung (Merck, Darmstadt, D) eingelegt. Anschließend wurden sie in eine Einbettkassette gegeben, entkalkt und in Paraffin (Paraplast, McCormick, St. Louis, USA) eingebettet. Konnten die eingebetteten Konstrukte nicht sofort geschnitten werden wurden sie bis dahin bei – 20 °C gelagert. Das Schneiden in 7 µm dicke Schnitte erfolgte mit einem Mikrotom (SM2400, Leica, Wetzlar, D) . Die Schnitte wurden danach bei Raumtemperatur gelagert.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen färben Kerne und Knorpelgrundsubstanz blauviolett, das Zytoplasma rosa-rot und eosinophile Granula rot an. Die paraffinierten Schnitte durchliefen zweimal eine 5 minütige Behandlung mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) und eine absteigende Alkoholreihe. Danach wurden sie für 10 Minuten in Hämalaun nach Mayer (Apotheke Klinikum

rechts der Isar) getaucht und anschließend 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Dann erfolgte eine Anfärbung mit Eosin (Apotheke Klinikum rechts der Isar) für weitere 3 Minuten, ehe die Schnitte 5 Minuten mit destilliertem Wasser gespült wurden. Schließlich erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (Merck, Darmstadt, D). Eingedeckt wurden die Schnitte anschließend mittels Eukitt (Kindler, Freiburg, D).

3.6.3 Azan-Novum-Färbung

Das Färben mit der Azan-Novum-Methode bewirkt eine Rotfärbung der Zellkerne und eine Blaufärbung kollagener Fasern. Für diese Färbung wurden die Schnitte ebenfalls 2 mal 5 Minuten mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) sowie mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Nach kurzem spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 20 Minuten in Kernechtrot (Chroma, Münster, D) getaucht und anschließend wiederum kurz mit destilliertem Wasser gespült. Daraufhin erfolgte eine 15-minütige Behandlung mit 5 %iger Wolframatophosphorsäure und erneute Spülung. Nun wurden die Schnitte für 8 Minuten in ein Gemisch bestehend aus 0,5 g Anilinblau (Apotheke Klinikum rechts der Isar) und 2 g Orange G (Chroma, Münster, D) gelöst in 100 ml destilliertem Wasser getaucht und wiederum gespült. Anschließend erfolgte dreimal eine 1-minütige Behandlung mit Xylol (Merck, Darmstadt, D), bevor die Schnitte mittels Eukitt (Kindler, Freiburg, D) eingedeckt wurden.

3.6.4 Alcianblau-Kernechtrot-Färbung

Eine Alcianblau-Kernechtrot-Färbung ist durch rötlich erscheinende Zellkerne und blau gefärbte saure Mucopolysaccharide gekennzeichnet. Dafür wurden die Schnitte nach einer 10-minütigen Behandlung mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen und kurz gespült. Dann erfolgte die Färbung mit Alcianblaulösung (Merck, Darmstadt, D) für 5 Minuten und anschließendem Spülen unter fließendem Leitungswasser. Nun wurden die Schnitte für 10 Minuten in Kernechtrotlösung (Chroma, Münster, D) getaucht und wieder 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült.

Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe und einer abschließenden Behandlung mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) wurden die gefärbten Schnitte nun mit Hilfe von Eukitt (Kindler, Freiburg, D) eingedeckt.

3.6.5 Safranin O/Fast Green-Färbung

Die Safranin O-Färbung dient zur selektiven Darstellung der Glykosaminoglykane des Knorpelgewebes, welches sich proportional zum Gehalt an Glykosaminoglykanen Rot färbt. Durch diese Proportionalität wird es als semiquantitative histochemische Methode für die Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes im Knorpelgewebe angesehen (von der Mark, 1990). Im Rahmen dieser Färbung werden die Schnitte durch eine Behandlung mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) und einer absteigendem Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend erfolgt für 10 Minuten die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Roth, Karlsruhe, D). Nach 10 Minuten Spülen unter fließendem Leitungswasser werden die Schnitte 5 Minuten lang in 0,1 %ige Lichtgrün-Lösung (Apotheke Klinikum rechts der Isar) getaucht und höchstens 10 Sekunden lang mit 1 %iger Essigsäure (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gespült. Als letzter Farbstoff kommt danach für 5 Minuten Safranin O-Färbelösung (Roth, Karlsruhe, D) zum Einsatz. Anschließend wird mit 95 %igem Isopropanol (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gespült und mit einer aussteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach einer erneuten Behandlung mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) erfolgt nun die Eindeckung mit Eukitt (Kindler, Freiburg, D).

3.7 Immunhistochemie

CD-31 (PECAM-1, Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) ist ein in Endothelzellen und Thrombozyten exprimiertes transmembranes Glykoprotein. Es spielt eine wichtige Rolle bei Zelladhäsionsvorgängen und soll auch an Thrombogenese, Wundheilung und Angiogenese beteiligt sein (DeLisser, 1994). Da Antikörper gegen CD-31 nur Gefäße und Blutzellen anfärben, stellen sie eine gute Möglichkeit zur immunhistologischen Untersuchung vaskulärer Prozesse wie Tumoren oder der Neovaskularisation von Gewebeverbänden dar (Ismail, 2003). Somit lassen sich auch

Gefäßeingressungen in die implantierten Knorpelkonstrukte nachweisen. Dazu wurden die 7 µm dicken Paraffinschnitte zunächst 10 Minuten mit Xylol (Merck, Darmstadt, D) vorbehandelt und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Daraufhin erfolgte eine 10-minütige Behandlung mit 3 %igem H₂O₂ (Apotheke Klinikum rechts der Isar) sowie ein Spülen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte zur Verbesserung der nachfolgenden Anfärbung mit Fast Enzyme (Zytomed, Berlin, D) vorbehandelt. dabei handelt es sich um eine Enzymlösung, die Epitope der anzufärbenden Zellen demaskiert und den Antikörpern damit die Bindung erleichtert. Danach wurden die Schnitte 2 Minuten mit PBS-Pufferlösung (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären CD-31 Antikörper (Biocare, Concord, USA) in einer Verdünnung von 1:100 bei Raumtemperatur über 120 Minuten. Danach wurde wieder 2 Minuten mit PBS gespült und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Rat Probe (HRP-Polymer Detection Kit, Biocare, Concord, USA) behandelt, welches an den primären Antikörper bindet. Nach erneuter Spülung mit PBS wurde nun mit Meerrettichperoxidase (HRP-Polymer Detection Kit, Biocare, Concord, USA) als Chromogen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) als Peroxidasesubstrat für 15 Minuten hinzugegeben und danach mit Leitungswasser gespült. Es wurde dann 30 Sekunden mit Hämalaun nach Maier (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gegengefärbt und mit Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in Aquatex (Merck, Darmstadt, D) einedeckt.

3.8 Biochemische Analysen

3.8.1 Vitalitätsfärbung

Je eine Hälfte der Konstrukte, die für die biochemischen Untersuchungen verwendet wurden, wurden unmittelbar nach der Explantation mittels einer Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Vitalität hin untersucht. Dazu wurden die Konstrukthälften in einer Petrischale in dünne Streifen geschnitten und auf

einen Objektträger aufgebracht. Es wurde eine Kombinationsfärbung durchgeführt, bestehend aus Fluoreszin Diacetat (FDA, Biomol, Hamburg, D) und Propidiumjodid (PI, MP Biomedicals, Hamburg, D). Dabei dringt Propidiumjodid in membrangeschädigte Zellen ein und färbt diese Rot an, während Fluoreszin in vitalen Zellen enzymatisch zu einem grün fluoreszierenden Metaboliten abgebaut wird. Propidiumjodid wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser gelöst, während 25 mg Fluoreszin in 1 ml Aceton (Apotheke Klinikum rechts der Isar) gelöst wurde. Je 0,5 ml beider Lösungen wurden in ein Becherglas mit 60 ml destilliertem Wasser gegeben, welches mit Aluminiumfolie lichtgeschützt wurde. 50 ml dieser Mischung wurden anschließend in einem Falconröhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One, Essen, D) bei 2000 upm zentrifugiert. Nun wurden die Konstruktstreifen auf dem Objektträger mit der Färbelösung überschichtet und 60 Sekunden dort belassen, um einzuwirken. Der Objektträger wurde daraufhin unter einem Mikroskop mit eingebauter Kamera (Axiovert 125 TV, Zeiss, Jena, D) mit Hilfe verschiedener Lichtfilter untersucht. Für die Lebendfärbung durch Fluoreszin wurde ein blauer Lichtfilter (Zeiss, Jena, D) mit 496 nm Wellenlänge verwendet, die Emission wurde bei 520 nm bestimmt. Von dieser Lebendfärbung wurde nun am PC eine Aufnahme mit einem Videoprogramm (Axiovision, Zeiss, Jena, D) angefertigt. Nun wurde für die Totfärbung mit Propidiumjodid ein grüner Lichtfilter (Zeiss, Jena, D) mit 546 nm Wellenlänge verwendet und die Emission bei 580 nm bestimmt. Auch hiervon wurde eine Aufnahme angefertigt. Nun wurden beide Aufnahmen mittels Axiovision (Zeiss, Jena, D) übereinander gelegt und ergaben somit eine gute Übersicht über das Verhältnis vitaler zu geschädigter Zellen. Sämtliche Vitalitätsfärbungen wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um eine Zersetzung der Farbstoffe bei Lichtexposition zu vermeiden.

3.8.2 Papainverdau

Die bei -30°C gelagerten Konstrukthälften wurden unter einem Laminar Air Flow (Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific, Bonn, D) mit einer sterilen Schere zerkleinert. Zur Durchführung der photometrischen und spektrometrischen Untersuchungen wurden die Konstrukte anschließend mit

der Sulphydrylprotease Papain Type III (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) verdaut. Dazu wurde ein 0,1 molarer Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, D) Puffer mit 0,01 molarem EDTA (Merck, Darmstadt, D) angesetzt und mittels Kontrolle durch ein pH-Meter auf einen pH von 6,0 eingestellt. Mit einem Zellulose-Acetatfilter von 0,22 μm Porengröße wurde diese Pufferlösung unter einem Laminar Flow steril filtriert. Jegliche Entnahmen aus dieser Stocklösung erfolgten mit sterilen Pipettenspitzen ebenfalls unter Laminar Flow. Mit diesem Puffer wurde eine 0,01 molare Cystein-HCl-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) hergestellt, in der daraufhin 0,125 mg/ml Papain Type III (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) gelöst wurden. Diese Verdauung wurde immer sofort verbraucht. Mit jeweils 1 ml dieser Verdauung wurden die zerkleinerten Konstrukte in einem Polypropylenröhrchen bei 60 °C für 16 Stunden im Wasserbad (Type 1083, GFL, Burgwedel, D) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 10000 upm für 10 Minuten zentrifugiert (Universal 30 RF Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, D) und der Überstand bis zur Durchführung der biochemischen Untersuchungen bei 4 °C gelagert.

3.8.3 Bestimmung des DNA-Gehalts

Mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) kann die Zellularität eines Konstruktes indirekt bestimmt werden. Dies geschieht über die Messung der Gesamt-DNA, wobei der DNA-Gehalt eines Chondrozyten mit 7,7 pg veranschlagt wird (Kim, 1988).

Der Bisbenzimidazol-Farbstoff Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem TEN-Puffer gelöst. Dieser TEN-Puffer besteht aus einer 0,1 molaren Lösung von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S), 0,001 molarem Na_2EDTA (Merck, Darmstadt, D) und 0,1 molarem NaCl (Merck, Darmstadt, D) bei einem pH von 7,4. In einem Polypropylen-Röhrchen wurde diese Lösung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Zur Erstellung einer Standardverdünnungsreihe wurde Kalbsthymus-DNA (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,1 molarem Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, D) und 0,01 molarem Na_2EDTA bei einem pH-Wert von 7,4 gelöst. Hergestellt wurden Verdünnungen aus 5

$\mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $15 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$, und $25 \mu\text{g/ml}$ sowie ein Leerwert. Aus der voran beschriebenen Pufferlösung von Hoechst 33258 Farbstoff und TEN-Puffer wurde für die fluoreszenzspektrometrischen Messungen eine Gerauchsverdünnung von $0,1 \mu\text{g/ml}$ wiederum in TEN-Puffer hergestellt. Jeweils $100 \mu\text{l}$ der Standardverdünnung aus Kalbsthymus-DNA bzw. der Proben wurden mit 2 ml Gebrauchsverdünnung des Farbstoffs gemischt. Aus der entstehenden Mischung wurden jeweils $250 \mu\text{l}$ in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96F Nunclon Delta black Mikrowell SI, Nunc, Roskilde, Dk) pipettiert. In einem automatischen Fluoreszenzspektrometer (Chameleon multilabel detection platform, Deelux, Gödenstorf, D) wurden die Proben anschließend ausgewertet. Hierbei betrug die Exzitationswellenlänge 360 nm , die Emission wurde bei 460 nm gemessen. Alle Werte der Emissionen wurden dreifach bestimmt.

3.8.4 Bestimmung des Gehalts an Glykosaminoglykanen

Sulfatierte Glykosaminoglykane stellen eine wichtige Komponente hyalinen Knorpels dar. Daher eignet sich ihre Quantifizierung gut zur Untersuchung tissue-engineerten Knorpelgewebes. In Anlehnung an die Veröffentlichungen Farndales (Farndale, 1982, Farndale, 1986) wurde der Papainverdau daher mit 1,9-Dimethylmethylenblau (Merck, Darmstadt, D) versetzt und photometrisch gegen eine Standardreihe aus Chondroitinsulfat C (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) gemessen. In 5 ml Ethanol wurden unter Rühren 16 mg 1,9-Dimethylmethylen Blau gelöst und mit einem Puffer aus $0,04 \text{ molarem NaCl}$ und $0,04 \text{ molarem Glycin}$ mit einem pH Wert von 3 auf einen Liter aufgefüllt. Diese Gebrauchslösung wurde in einer braunen Glasflasche bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Stocklösung Chondroitinsulfat C (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) mit einer Konzentration von $0,3 \text{ mg/ml}$ wurde in einem Puffer aus $0,1 \text{ molarem N}_2\text{HPO}_4$ und $0,01 \text{ molarem Na}_2\text{EDTA}$ bei pH 7,4 gelöst. Hieraus wurden Verdünnungen mit $300 \mu\text{g/ml}$, $240 \mu\text{g/ml}$, $180 \mu\text{g/ml}$, $120 \mu\text{g/ml}$, $60 \mu\text{g/ml}$ sowie ein Leerwert hergestellt. Jeweils $100 \mu\text{l}$ Probe oder Standardverdünnung wurde mit 2 ml des Nachweisreagenz gemischt. Aus dieser Mischung wurden je $250 \mu\text{l}$ entnommen und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Costar 96 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated,

Corning, USA) pipettiert. Der Gehalt an Glykosaminoglykanen wurde durch die Bestimmung der Extinktion der einsetzenden Farbreaktion durch ein automatisches Photometer (Chameleon Multilabel Detection Platform, Deelux, Gödenstorf, D) bei einer Wellenlänge von 523 nm ermittelt. Alle Extinktionen wurden dreifach bestimmt.

3.9 Statistik

Aufgrund der Gruppengröße der quantitativen Analysen mit 7 Tieren wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Medians und dessen Spannweiten ermittelt, welche 95 % Konfidenzintervallen entsprechen. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanzen wurden die Tests nach Mann-Whitney-U und Wilcoxon-W verwendet sowie der Z-Wert bestimmt. Statistische Signifikanzen ergaben sich bei p-Werten $< 0,05$. Der Korrekturfaktor für p-Werte zur Adjustierung des multiplen Testproblems im Sinne der Bonferroni-Korrektur betrug 12.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkulturen

Die Zerkleinerung des verarbeiteten Knorpels und die Gewinnung von Einzelzellen ließen sich sicher reproduzierbar durchführen. Mit Hilfe der Trypanblau-Methode konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten die Isolierung gut tolerierten. Die Knorpelproben wogen durchschnittlich 0,5 Gramm und enthielten $3,5 \times 10^5$ Zellen. In Monolayer-Kultur erfolgte eine räumlich homogene Proliferation, ein Wachstum in mehreren Schichten konnte nicht beobachtet werden. Nach 2 Passagen konnte die Zellzahl einer Knorpelprobe auf durchschnittlich 30×10^6 Zellen erhöht werden. Nach wenigen Tagen in Monolayer-Kultur zeigte sich ein Verlust der ursprünglich runden Morphe der Zellen und der Ausbildung einer langgestreckten, polygonen Form. Diese schon von anderen Autoren vorgeschriebenen Veränderungen stehen in engem Zusammenhang mit dem Verlust knorpelspezifischer Synthesefunktionen (Green, 1971, von der Mark, 1977). Dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Funktionsverlust ist jedoch reversibel, sobald die Konstrukte in einer drei-dimensionalen Umgebung ihre sphärische Konfiguration wieder annehmen können (Benya, 1982). Die anschließende Besiedlung der Polyurethankonstrukte mit Hilfe des Fibrinklebers ließ sich ebenfalls sicher reproduzierbar durchführen und zeigte lichtmikroskopisch eine homogene Verteilung der Zellen innerhalb der Poren der Konstrukte.

4.2 Versuchstiere

Narkose und operative Eingriffe wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Weder Infektionen noch andere Komplikationen traten im weiteren Verlauf der Versuche auf. Keines der Versuchstiere verstarb vorzeitig.

4.3 Auswertung der histologischen Untersuchungen

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In den beiden Kontrollgruppen zeigte sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung eine homogene Färbung der besiedelten Poren der Polyurethane. An den Rändern der Konstrukte kam es durch Einwachsen tierischen Bindegewebes, welches auch durch die Silikonabschottung nicht verhindert werden konnte, zu einer intensiveren Anfärbung. In den Kontrollen der Gruppe 1, die insgesamt 4 Wochen in vivo verbrachten, zeigte sich eine nur geringe Färbeintensität. In den Kontrollen der Gruppe 2, welche für insgesamt 9 Wochen im Konstrukt belassen wurden, war diese diskret erhöht und zeigte Anzeichen für bindegewebige Fasern ähnlich wie die Randbereiche der Konstrukte. Die Morphologie der Zellen selbst zeigte rund-ovale und in Lakunen eingebettete Zellen, welche sich lichtmikroskopisch in beiden Kontrollgruppen nicht unterschieden.

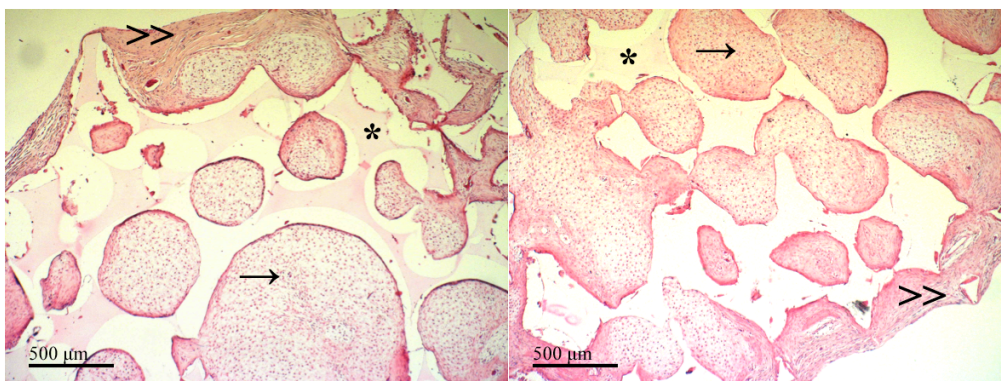


Abbildung 5: Konstrukte ohne Gefäßanschluss der Gruppe 1 (linkes Bild) und 2 (rechtes Bild). Man erkennt zahlreiche Zellkerne in den ausgefüllten Konstruktzellen (schwarzer Pfeil), jedoch nur wenig angefärbte extrazelluläre Matrix. Zwischen den zellreichen Zellen befindet sich die Konstruktmatrix (Stern). An den Konstruktträgern zeigt sich eingewachsen Bindegewebe (Doppelpfeil). H.E.-Färbung, Vergrößerung 10x.

Die Konstrukte mit Gefäßanschluss in beiden Gruppen zeigten eine intensivere Färbung als ihre jeweiligen Kontrollen. Insbesondere in der Nähe der inserierten Gefäße zeigte sich eine deutliche Mehranfärbung, was auf einen verstärkten Gehalt an extrazellulärer Matrix an diesen Stellen hinweist. Die Konstrukte der Gruppe 2 mit Gefäßanschluss über 6 Wochen zeigten im Vergleich zu denen der Gruppe 1 nochmals eine deutliche Steigerung in der Farbintensität. Allerdings gab es auch in den Konstrukten mit Gefäßanschluss Bereiche, vornehmlich fernab der Gefäße, welche ein ähnliches Färbeverhalten zeigten wie ihre Kontrollen im gesamten Konstrukt. In den intensiv gefärbten Bereichen mit starkem Gehalt an extrazellulärer Matrix zeigten sich die Zellen morphologisch verändert, insbesondere ihre lakunäre Struktur betreffend.

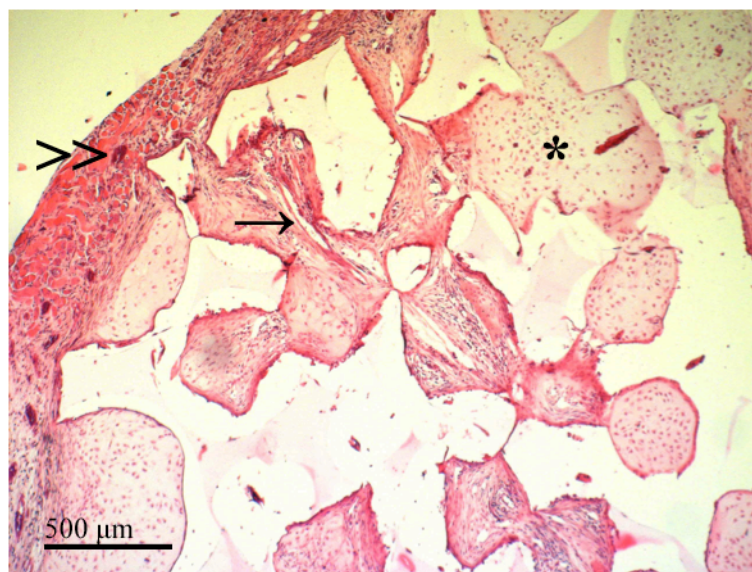


Abbildung 6: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 1. Man erkennt den Anschnitt des zentral inserierten Gefäßes (schwarzer Pfeil) und zahlreiche kleinere Gefäßausprossungen daraus. Peripher davon finden sich zellgefüllte Konstruktwaren (Stern) mit geringerer Färbintensität als um das zentrale Gefäß herum. Am Konstruktrand einwachsendes Bindegewebe (Doppelpfeil). H.E.-Färbung, Vergrößerung 10x.

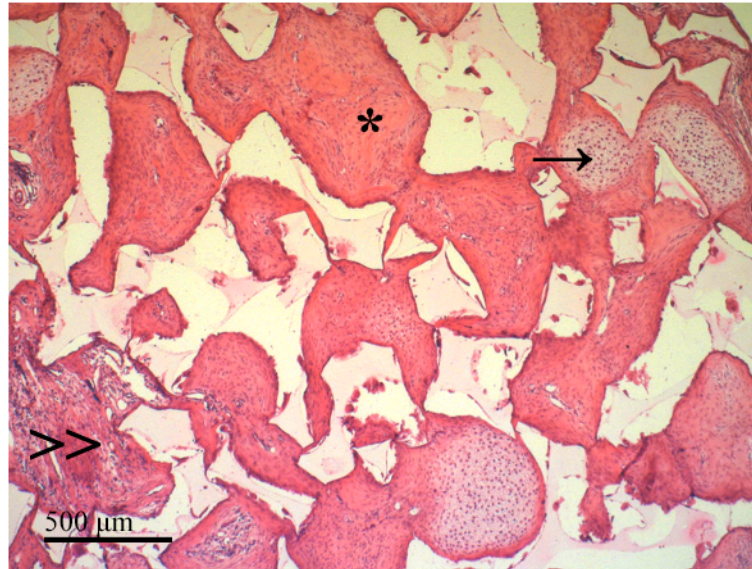


Abbildung 7: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 2. Man sieht noch einen Anschnitt des zentralen Gefäßes (Doppelpfeil). Die meisten Konstruktwaren zeigen jetzt eine starke Färbeintensität bei gleichzeitigem Verlust der lakunären Form der Zellen (Stern). Im Zentrum einiger, überwiegend peripher gelegener Waren geringere Färbeintensität und weniger bindegewebige Fasern (schwarzer Pfeil). H.E.-Färbung, Vergrößerung 10x.

Insgesamt zeigte die H.E.-Färbung eine Zunahme an Farbtintensität (und damit des Gehalts an extrazellulärer Matrix) mit zunehmender Dauer des Verbleibs in vivo sowie der Nähe zu den inserierten Gefäßen. Die Morphologie der Zellen war ebenfalls von diesen Faktoren abhängig und zeigte in diesen Bereichen einen zunehmenden Verlust der Lakunen sowie der typischen chondrozytären Struktur.

4.3.2 Azan-Novum-Färbung

In der Azan-Novum-Färbung zeigte sich wie in der H.E.-Färbung eine Zunahme der Färbeintensität an den Konstruktträgern durch einwachsendes tierisches Bindegewebe. In den Kontrollen beider Gruppen ließ sich eine homogene Verteilung der rund-ovalen, lakunären Zellen im Konstrukt beobachten. Auch hier wiesen die Kontrollen der Gruppe 2 eine leicht intensivere Färbung als die Kontrollen der Gruppe 1 bei ansonsten sehr ähnlichem Erscheinungsbild auf.

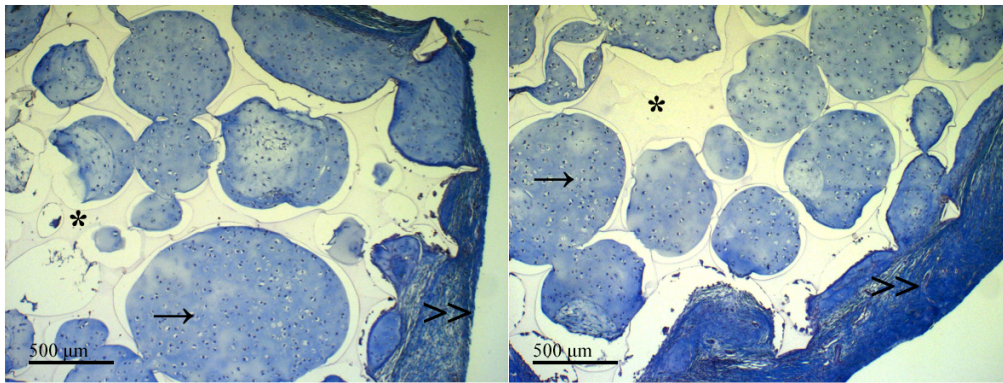


Abbildung 8: Konstrukte ohne Gefäßanschluss der Gruppe 1 (linkes Bild) und 2 (rechtes Bild). Besser als in der H.E.-Färbung ist hier die lakunäre, knorpeltypische Struktur innerhalb der zellreichen Konstruktmatrizen zu erkennen (schwarzer Pfeil). Dazwischen Konstruktmatrix (Stern), an den Konstruktändern erneut einwachsendes Bindegewebe (Doppelpfeil). Azanfärbung, Vergrößerung 10x.

Bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine deutliche Farbintensivierung vor allem in Nähe zu den inserierten Gefäßen sowie in den Randbereichen der einzelnen Polyurethanporen. Dies fällt besonders in der Gruppe 2 auf, deren Konstrukte sehr viel stärker mit extrazellulärer, zirkulär um die einzelnen Poren angeordneter Matrix durchsetzt sind als die der Gruppe 1. Darüber hinaus verlieren die Zellen vor allem in Gruppe 2 deutlich ihre chondrozytäre Morphe.

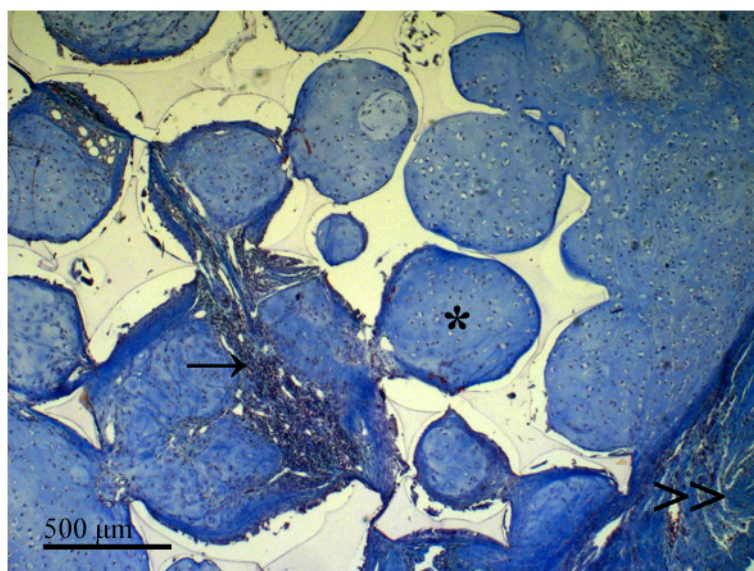


Abbildung 9: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 1. Man erkennt den Anschnitt des zentralen Gefäßes (schwarzer Pfeil), in dessen Nähe die Färbintensität höher ist, die chondrozytäre Morphe jedoch geringer ist als in den Konstruktmatrizen weiter peripher (Stern). Am Konstrukttrand einwachsendes Bindegewebe (Doppelpfeil). Azanfärbung, Vergrößerung 10x.

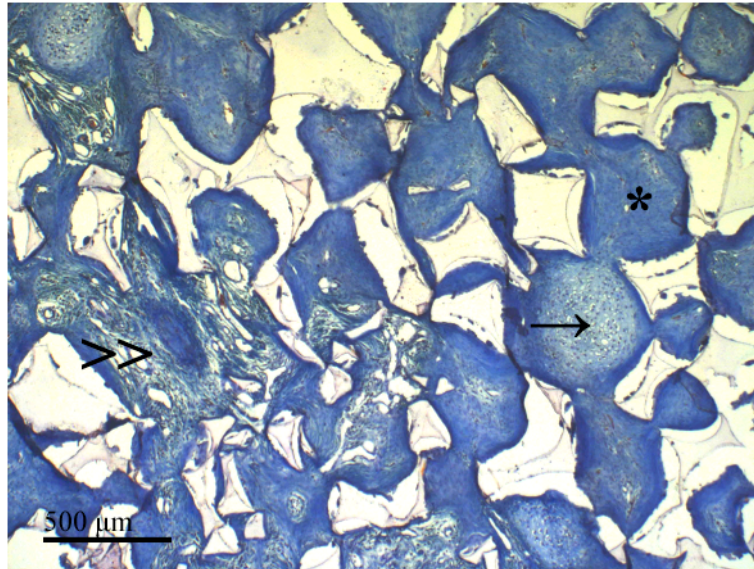


Abbildung 10: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 2. Man erkennt das zentrale Gefäß (Doppelpfeil) sowie zahlreiche daraus aussprossende Gefäße, in deren Nähe sich reichlich faseriges, jedoch weniger chondrozytäres Gewebe befindet. Weiter peripher zeigen sich im Inneren einiger Waben noch Reste des lakunären Knorpelgewebes mit deutlich weniger extrazellulärem Gewebe (schwarzer Pfeil). Der Großteil der Waben erscheint bindegewebig umgebaut (Stern). Azanfärbung, Vergrößerung 10x.

4.3.3 Alcianblau-Kernechtrot-Färbung

In der Alcianblau-Kernechtrot-Färbung zeigte sich in den Kontrollen beider Gruppen eine homogene Anfärbung der Glykosaminoglykane zwischen den Zellen. Diese zeigten deutlich eine chondrozytäre Morphologie mit Lakunenbildung. Wie schon in den vorangegangenen Färbungen erwies sich die Färbung der Kontrollen der Gruppe 2 als intensiver.

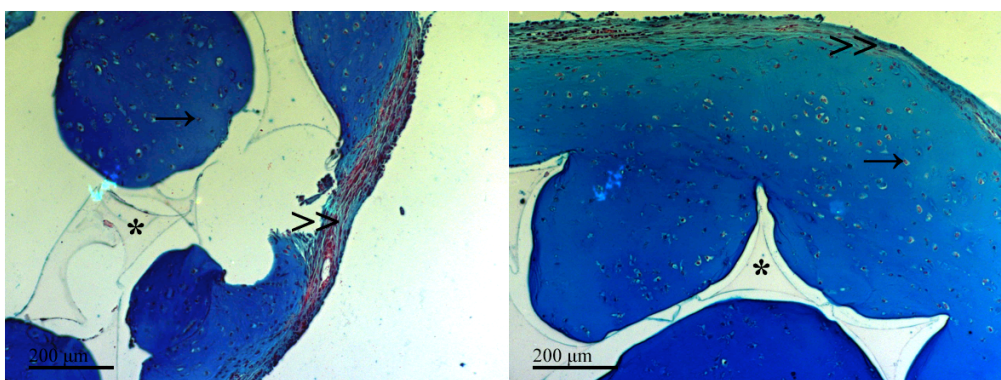


Abbildung 11: Konstrukte ohne Gefäßanschluss der Gruppe 1 (linkes Bild) und 2 (rechtes Bild). Deutlich zeigt sich sowohl eine lakunäre, knorpeltypische Morphe als auch eine deutliche Anfärbung der knorpelspezifischen Glykosaminoglykane (schwarzer Pfeil). Die Konstruktmatrix bleibt von der Färbung unberührt (Stern). Am Konstruktrand einwachsendes Bindegewebe (Doppelpfeil). Alcian-Blau-Färbung, Vergrößerung 20x.

In den Konstrukten mit Gefäßanschluss bestätigten sich die in H.E.- und Azan-Färbung gemachten Beobachtungen. In Gruppe 1 ließen noch viele der Polyurethanporen deutliche Anfärbung und knorpelähnliche Gewebestruktur erkennen, nur in Gefäßnähe zeigte sich eine Minderanfärbung und vermehrt faserartige Strukturen. In Gruppe 2 hingegen wiesen die meisten Poren nur in ihrem Zentrum noch knorpelspezifische Architektur auf, in ihrer Peripherie hingegen zeigten sich zirkulär angeordnete, faserartige Strukturen mit deutlicher Minderanfärbung.

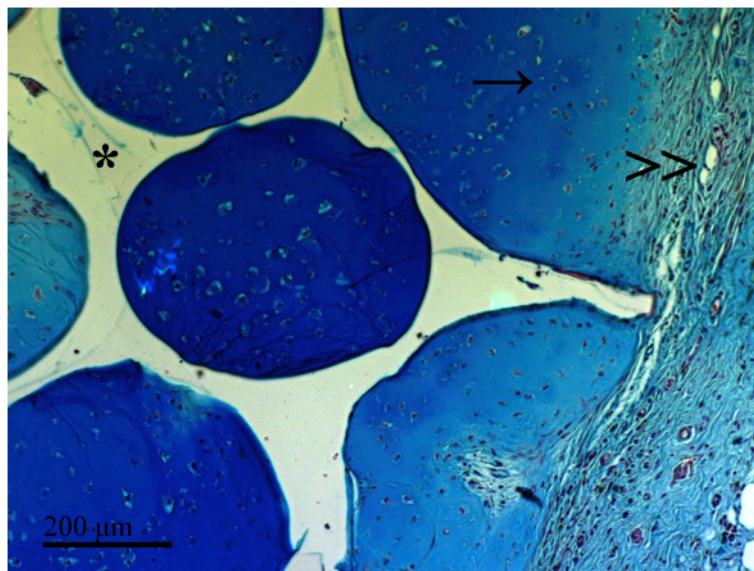


Abbildung 12: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 1. Man erkennt das zentrale Gefäß (Doppelpfeil) sowie weniger angefärbte und bindegewebigere Areale in dessen Nähe. Mit zunehmender Entfernung zum Hauptgefäß zeigt sich eine Zunahme der Färbintensität für Glykosaminoglykane und vermehrt chondrozytäre Zellmorphie (schwarzer Pfeil). Das Konstruktgerüst bleibt ungefärbt (Stern). Alcian-Blau-Färbung, Vergrößerung 20x.

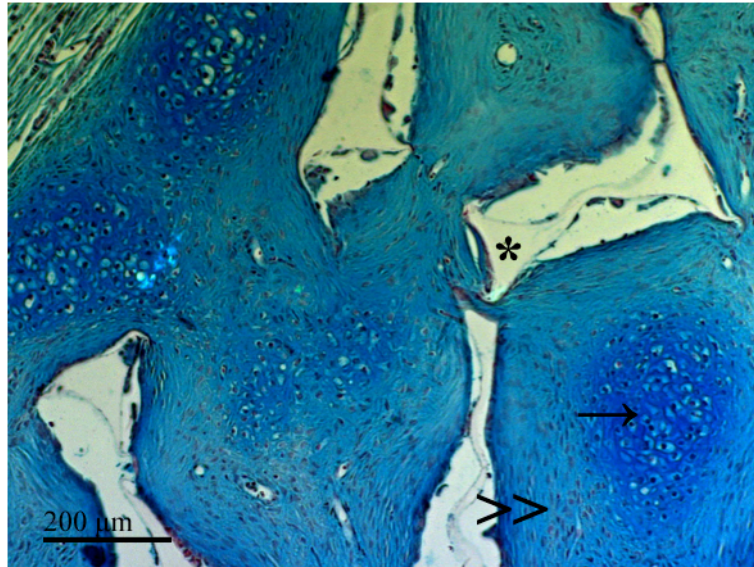


Abbildung 13: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 2. Wie in der vorherigen Färbungen findet man die lakunäre und knorpeltypische Zellform sowie vermehrte Anfärbung von Glykosaminoglykanen nur noch in den Zentren einiger Konstruktzellen (schwarzer Pfeil). Darum bildet sich ein Randsaum aus bindegewebigen Fasern, deren Färbintensität deutlich geringer ist (Doppelpfeil). Das Konstruktgerüst bleibt ungefärbt (Stern). Alcian-Blau-Färbung, Vergrößerung 20x.

4.3.4 Safranin-O / Fast Green-Färbung

In der Safranin-O-Färbung zeigte sich bei den Kontrollen beider Gruppen ähnlich der Alcianblau-Färbung eine homogene Anfärbung der Polyurethanporen, entsprechend einem hohem Gehalt an Glykosaminoglykanen, sowie eine zellmorphologisch chondrozytäre Gewebsstruktur. Die Kontrollen der Gruppe 2 wiesen abermals eine leicht intensivere Anfärbung auf.

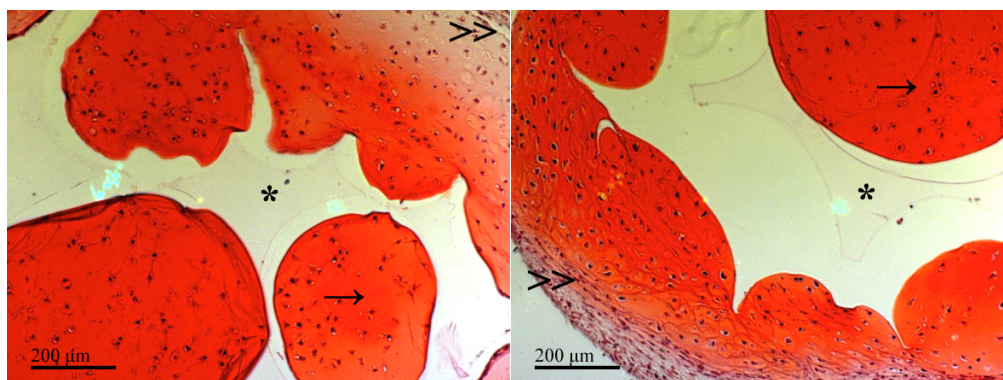


Abbildung 14: Konstrukte ohne Gefäßanschluss der Gruppe 1 (linkes Bild) und 2 (rechtes Bild). Deutlich zeigte sich sowohl eine lakunäre, knorpeltypische Morphe als auch eine deutliche Anfärbung der knorpelspezifischen Glykosaminoglykane (schwarzer Pfeil). Die Konstruktmatrix bleibt von der Färbung unberührt (Stern). Am Konstruktrand einwachsendes Bindegewebe (Doppelpfeil). Safranin-O-Färbung, Vergrößerung 20x.

Die Konstrukte mit Gefäßanschluss zeigten mit den Beobachtungen der Alcianblau-Färbungen korrelierende Resultate. In Gruppe 1 ließen sich noch deutlich die chondrozytäre Struktur der Zellen und reichlich Anfärbungen von Glykosaminoglykanen finden. Lediglich in Gefäßnähe und in den Randbereichen der Polyurethanporen war die Farbtintensität geringer ausgeprägt. In Gruppe 2 hingegen ließ sich eine intensive Anfärbung entsprechend knorpelspezifischer extrazellulärer Matrix nur noch im Zentrum der jeweiligen Poren beobachten, an den Rändern dominierten faserartige Bindegewebsstrukturen mit deutlicher Minderanfärbung.

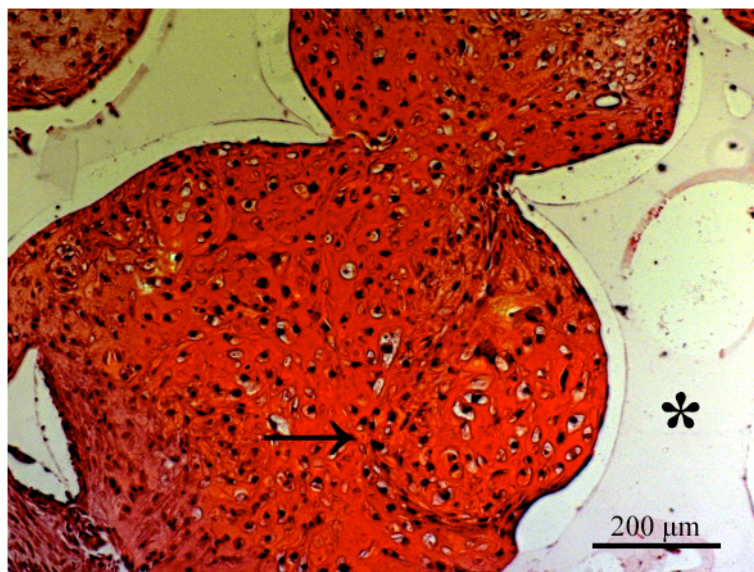


Abbildung 15: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 1. Es zeigen sich reichlich lakunäre Zellen mit starkem Färbeverhalten auf Glykosaminoglykanen (schwarzer Pfeil). Das Konstruktgerüst bleibt ungefärbt (Stern). Safranin-O-Färbung, Vergrößerung 20x.



Abbildung 16: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 2. Analog zur Alcian-Blau-Färbung zeigen sich hier nur im Inneren einiger Konstruktwaren noch knorpeltypische Zellen und stark angefärbte Glykosaminoglykane (schwarzer Pfeil). Den Großteil des besiedelten Konstruktes nehmen nur bindegewebige Areale ein, die zirkulär um die restlichen Knorpelinseln angeordnet liegen (Stern). Safranin-O-Färbung, Vergrößerung 20x.

4.4 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten bei den Kontrollen keinerlei Anfärbung gefäßartiger Strukturen im Inneren der Konstrukte. Lediglich an den Rändern der Konstrukte zeigten sich angefärbte Gefäße, welche trotz der Silikonabschirmung von außen eingewachsen waren. In den Konstrukten mit Gefäßanschluss zeigten sich vor allem rund um das inserierte zentrale Gefäß Einsprossungen kleiner und mittelgroßer Gefäße. Ebenso ließen sich im Inneren einzelner Poren des Konstruktes Anfärbungen gefäßartiger Strukturen erkennen. Allerdings wurden mitunter Strukturen, die bereits in Übersichtsfärbungen mikroskopisch deutlich als Gefäße zu erkennen waren, zum Beispiel anhand von im Lumen befindlichen Erythrozyten, nicht durch die Färbung erfasst. Dies gilt insbesondere für die zentralen inserierten Gefäße, deren Neueinsprossungen sich hingegen anfärben ließen. Mikroskopisch konnte kein augenscheinlicher Unterschied zwischen der Gefäßeinsprossung der beiden Kontrollgruppen untereinander oder zwischen den Konstrukten mit Gefäßanschluss beider Gruppen festgestellt werden. Aufgrund der teilweise

fehlenden Anfärbung einiger Gefäße war ein quantitativer Vergleich allerdings nicht möglich.



Abbildung 17: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 2. Man erkennt Anschnitte des zentralen Gefäßes, jedoch sind nur einige davon durch die Immunfärbung erfasst und bräunlich angefärbt (schwarze Pfeile). Die Matrix bleibt ungefärbt (Stern). CD-31-Färbung, Vergrößerung 20x.



Abbildung 18: Konstrukt mit Gefäßanschluss der Gruppe 2. Auf dem linken Bild ein Anschnitt des zentralen Gefäßes, auf dem rechten Bild eine Wabe mit eingesprossenen Gefäßen. Man erkennt die Anfärbung der Gefäße durch einen bräunlichen Randsaum (schwarze Pfeile in beiden Bildern). Sowohl um das inserierte Gefäß herum (linkes Bild) als auch in entfernteren Waben (rechtes Bild) kommt es zur Einsprossung von Gefäßen. Daneben gefäßfreies Gewebe (Stern). CD-31-Färbung, Vergrößerung 40x.

4.5 Auswertung der quantitativen Analysen

Insgesamt wurden 28 explantierte Konstrukte den quantitativen Analysen zugeführt (jeweils 14 Konstrukte mit Gefäßanschluss und 14 Kontrollen,

davon jeweils 7 aus Gruppe 1 und 2). Zuerst wurde die Gewichtsbestimmung durchgeführt, anschließend erfolgte der Verdau und die biochemischen Analysen. Sofern nicht anders angegeben, beschreiben die Werte den Median mit entsprechenden Spannweiten. Statistische Signifikanzen wurden sowohl zwischen den beiden Gruppen 1 und 2, als auch zwischen den Kontrollen untereinander beziehungsweise zwischen den Konstrukten mit Gefäßanschluss untereinander getrennt ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

Tabelle 2: Ergebnisse der quantitativen Analysen. Aufgrund der Gruppengröße wurde der Median mit Spannweiten verwendet. Bei Gewicht und DNA-Gehalt zeigen sich in den Konstrukten mit Gefäßanschluss höhere Werte als in den Kontrollen. Dagegen kommt es bei den Glykosaminoglykanen zu einer Abnahme bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss mit zunehmender *in vivo*-Dauer.

Parameter			Median	Minimum	Maximum
DNA in μg	Gruppe 1	Kontrolle	17,0	11,7	24,4
		Verum	31,5	23,1	58,8
	Gruppe 2	Kontrolle	18,8	16,9	22,7
		Verum	48,4	27,8	62,7
GAG in μg	Gruppe 1	Kontrolle	108	61	129
		Verum	285	127	345
	Gruppe 2	Kontrolle	165	102	204
		Verum	106	88	205
Gewicht in g	Gruppe 1	Kontrolle	,037	,035	,040
		Verum	,045	,022	,049
	Gruppe 2	Kontrolle	,035	,026	,041
		Verum	,042	,034	,050

4.5.1 Gewicht

Bei der Bestimmung des Gewichtes der explantierten Konstrukte zeigten sich deutlich höhere Werte bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss im Vergleich zu Ihren Kontrollen. Statistisch signifikant waren diese Unterschiede jedoch nur in Gruppe 2 ($p=0,013$), was auf die hohe Spannweite in Gruppe 1 ($p=0,064$) zurückzuführen ist. Beim Vergleich der Kontrollen beider Gruppen untereinander beziehungsweise der Verum-Konstrukte beider Gruppen

untereinander zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,304$ bzw. $p=0,929$).

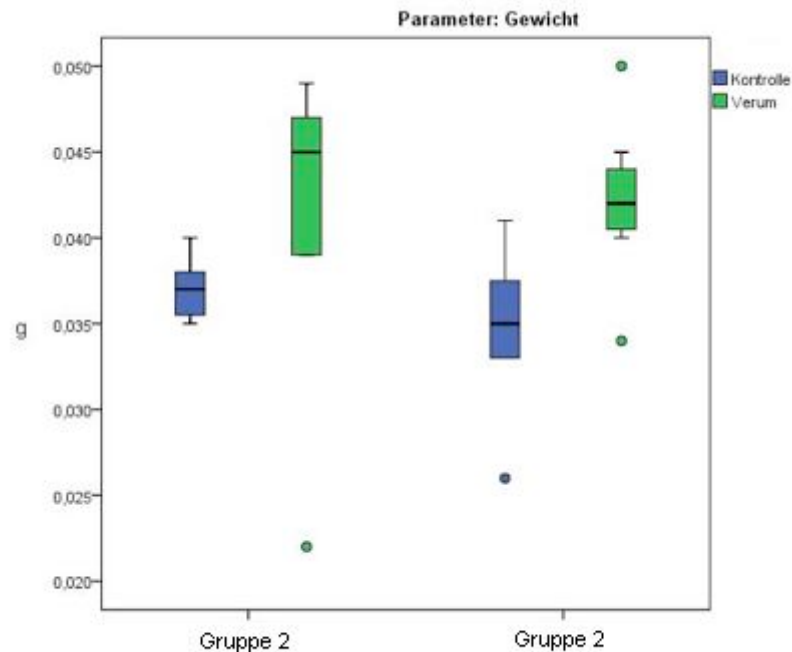


Abbildung 19: Ergebnisse der Gewichtsbestimmung. Deutlich höhere Werte bei Konstrukten mit Gefäßanschluss im Vergleich zu den Kontrollen. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

4.5.2 DNA-Assay

Die fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen zeigten innerhalb der beiden Gruppen einen deutlich höheren Gehalt an DNA bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss im Vergleich zu den Kontrollen. Sowohl in Gruppe 1 (Verum 31,5 μg vs 17,0 μg Kontrolle) als auch in Gruppe 2 (Verum 48,4 μg vs 18,8 μg Kontrolle) waren die Unterschiede statistisch signifikant ($p=0,002$ bzw. $p=0,001$). Im direkten Vergleich der Kontrollen beider Gruppen zeigte sich eine etwas höhere DNA-Menge in Gruppe 2 (18,8 μg vs 17,0 μg in Gruppe 1), wenngleich dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war ($p=0,197$). Im direkten Vergleich der Verum-Konstrukte beider Gruppen zeigte sich ein deutlich höherer Gehalt an DNA in Gruppe 2 (48,4 μg vs 31,5 μg in

Gruppe 1). Statistische Signifikanz erreichte dieser Unterschied jedoch nicht ($p=0,073$).

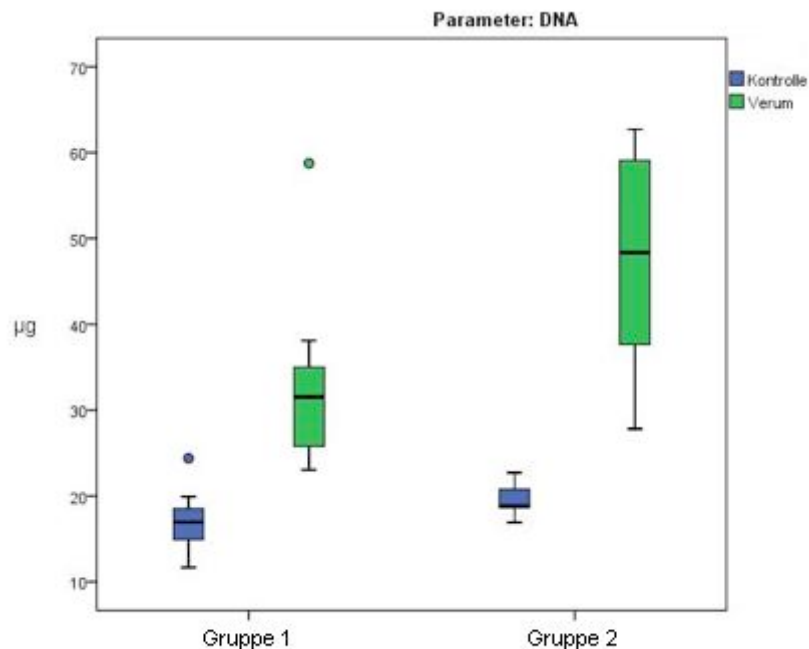


Abbildung 20: Ergebnisse der DNA-Messung. Deutlich höherer Gehalt in den Konstrukten mit Gefäßanschluss im Vergleich zu den Kontrollen. Ebenfalls höhere Werte in Gruppe 2 als in Gruppe 1, statistisch jedoch nicht signifikant.

4.5.3 GAG-Assay

Die photometrische Bestimmung des Gehalts an Glykosaminoglykanen erbrachte folgende Ergebnisse. In Gruppe 1 zeigte sich ein deutlich höherer Wert bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss als bei den Kontrollen (285 μg vs 108 μg). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,001$). In Gruppe 2 hingegen wiesen die Verum-Konstrukte einen geringeren Gehalt an Glykosaminoglykanen als die Kontrollen auf (106 μg vs 165 μg), wenngleich dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war ($p=0,364$). Beim Vergleich zwischen den Kontrollen beider Gruppen fiel ein statistisch signifikanter Unterschied mit höheren Werten in Gruppe 2 auf (108 μg in Gruppe 1 vs 165 μg in Gruppe 2, $p=0,007$). Der Vergleich der Konstrukte mit Gefäßanschluss beider Gruppen untereinander erbrachte ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied, jedoch mit höheren Werten in Gruppe 1 (285 μg in

Gruppe 1 vs 106 μg in Gruppe 2, $p=0,048$). Im Gegensatz zu den anderen quantitativen Analysen verliefen die Entwicklungen von Verum- und Kontrollkonstrukten der beiden Gruppen hier konträr zueinander.

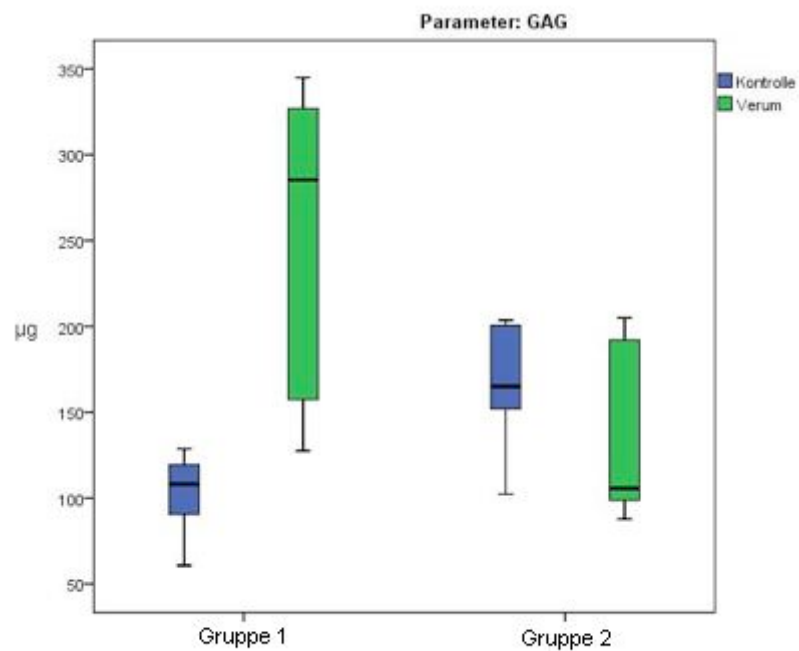


Abbildung 21: Ergebnisse der GAG-Bestimmung. Es zeigt sich hier eine konträre Entwicklung des Gehalts an GAGs mit zunächst starkem Anstieg und anschließendem Abfall der Konzentration bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss, während in den Kontrollgruppen eine kontinuierliche Zunahme beobachtet werden konnte.

5 Diskussion

Der Ersatz von körpereigenem Gewebe, welches durch Traumata, Tumoren oder Verschleiß untergeht, ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin (Langer, 1993). Auch an Ersatz für Knorpelgewebe besteht ein großer Bedarf, vor allem in der Orthopädie zum Ersatz von Gelenkknorpel (Chung, 2008), aber auch in der Kopf-Hals-Chirurgie zum Ersatz des formgebenden Strukturknorpels (Verwoerd-Verhoef, 1998). Aufgrund seiner Avaskulärität verfügt Knorpelgewebe über eine von Natur aus schlechte Regenerationskapazität (Campbell, 1969), und stellt daher besondere Herausforderungen bezüglich seines Ersatzes. Wie bei vielen Gewebearten steht Knorpel nur in begrenzter Menge zu Transplantationszwecken zur Verfügung. Bei autologer Transplantation entsteht ein Defekt an der Entnahmestelle, und größere Defekte können teilweise überhaupt nicht in benötigter Menge gewonnen werden. Allogene Transplantate hingegen weisen die Gefahr einer Abstoßungsreaktion auf Grund einer Immuninkompatibilität auf (Langer, 1993).

Ein neuer Ansatzweg zur Lösung dieser Problematik stellt das Tissue Engineering dar, welches einen Ersatz mit lebendem Gewebe ermöglicht, das entsprechend den individuellen Bedürfnissen des Patienten entworfen und verarbeitet werden kann (Vacanti, 1999). Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Fachgebiet und verwendet Techniken des Ingenieurwesens, der Biologie und der Medizin um biologische Ersatzmaterialien zu entwickeln, die Gewebefunktionen wiederherstellen, erhalten oder verbessern können (Vacanti, 1999). Erhebliche Fortschritte wurden in den vergangenen Jahren auf diesem Gebiet erreicht, insbesondere bei der Kultivierung von Knorpelgewebe *in vitro* (Bujia, 1993) sowie durch Verwendung dreidimensionaler Matrizen als Gerüst des zu züchtenden Knorpels (Chung, 2008). Durch Anpassung der Trägermaterialien bezüglich Porosität, Stabilität und Resorptionsgeschwindigkeit kann die Matrix für verschiedene Anforderungen speziell zugeschnitten angefertigt werden. (Guelcher, 2008).

5.1 Kulturbedingungen und Dreidimensionalität

In der vorliegenden Studie wurden Kulturbedingungen gewählt, welche sich besonders nach klinischen Aspekten orientierten. Verwendet wurden ausdifferenzierte Chondrozyten aus humanem Nasenseptumknorpel, das nach Routineoperationen ansonsten verworfen worden wäre. Knorpelgewebe septalen Ursprungs ist leicht zugänglich und verfügbar, muss jedoch vor einem Einsatz *in vivo* zunächst *in vitro* vermehrt werden, um eine ausreichende Zellzahl zu gewährleisten (Kafienah, 2002a). Diese *in vitro* Vermehrungen finden in Monolayerkultur statt. Es ist bekannt, dass hierbei die Chondrozyten teilweise entdifferenzieren und eine Fibroblasten-artige Form annehmen (Bujia, 1993, Goessler, 2006b, Chung, 2008), so wie es auch in unseren Versuchen zu beobachten war. Da dies bei wiederholtem Passagieren zunehmend stärker auftritt, wurde die Zahl der Passagen auf 2 begrenzt. Ebenfalls zeigen die meisten Studien zu Monolayerkulturen von Chondrozyten, dass hierbei noch keine signifikanten Mengen extrazellulärer Matrix gebildet werden (Benya, 1982, Bujia, 1993). Um sich trotz beginnender Entdifferenzierung und noch fehlender Produktion von extrazellulärer Matrix anschließend zu funktionstüchtigem Knorpelgewebe entwickeln zu können, müssen die Chondrozyten in eine dreidimensionale Umgebung überführt werden. Benya konnte zeigen, dass in einer solchen Umgebung nicht nur die Synthese extrazellulärer Matrix stattfinden, sondern auch bereits entdifferenzierte Zellen wieder redifferenzieren und eine knorpeltypische Morphe einnehmen können (Benya, 1982).

Als Leitstruktur für ein dreidimensionales Wachstum stehen heute zahlreiche Materialien zur Verfügung (Chung, 2008, Guelcher, 2008). Natürliche Materialien wie Fibrin oder Kollagen ermöglichen Zell-Matrix-Interaktionen und üben damit einen proliferationsfördernden und differenzierenden Einfluss auf die eingebrachten Zellen aus (Eyrich, 2007a). Synthetische Materialien, wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete Polyurethan, bieten dagegen eine größere Stabilität durch eine verzögerte Resorption des Trägermaterials sowie ein großes Maß an Flexibilität bei strukturellen Eigenschaften im Herstellungsprozess (Guelcher, 2008). Aufgrund dessen und wegen der

erleichterten Gefäßinsertion bei einem festen, gut schneidbaren Material, entschieden wir uns in dieser Studie für die Verwendung des porösen Polyurethanschaumstoffes.

Die Überführung der Zellen erfolgte in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen je Konstrukt. Diese hohe initiale Zellzahl ermöglicht eine möglichst vollständige Besiedelung des gesamten Konstrukts und somit eine möglichst hohe Kontaktfläche von Zellen und Matrix (Eyrich, 2007b). Einige Studien belegten geringe Zellzahlen und nur wenig stattfindende Matrixproduktion bei besiedelten dreidimensionalen Konstrukten, die in vitro kultiviert wurden, und vermuteten dahinter ein mögliches Abdiffundieren der noch nicht angehafteten Zellen und der extrazellulären Matrix in das umgebende Medium (Sittinger, 1996). Eine Lösung hierfür stellte die zusätzliche Verwendung biomimetischer Zellträger dar, mit welchen nicht nur das Anhaften der Zellen im Konstrukt verbessert und somit den Verlust von Zellen in das Kulturmedium vermindert wurde, sondern gleichzeitig eine Zell-Matrix-Interaktion ermöglicht wurde, die das synthetische Material des Konstruktes bis dahin nicht besaß (Hutmacher, 2003, Terada, 2005, Eyrich, 2007a, Eyrich, 2007b). Diese Kombination aus Hydrogel, in diesem Falle Fibrinkleber, und Polyurethanmatrix stellte im Hinblick auf die Anforderungen, die unsere Versuche an das zu verwendende tissue-engineerte Material hatte, die für uns geeignete Matrix dar. Hierdurch konnte nicht nur die Besiedlungseffizienz deutlich gesteigert werden, da ein deutlich höherer Prozentsatz der eingebrachten Zellen auch im Konstrukt verblieb, auch die drei-dimensionale Verteilung innerhalb des Konstruktes verlief gleichmäßiger, als es ohne Fibrinkleberkomponente der Fall ist (Sittinger, 1996).

5.2 Knorpel und Vaskularisierung

Zunehmend rückt auch ein weiteres, inhärentes Problem des Tissue Engineerings in den Fokus von Studien: die Notwendigkeit einer suffizienten Nährstoffversorgung des gezüchteten Gewebeverbandes. Ohne eine konstante Zufuhr an Nährstoffen sowie die Möglichkeit des Abtransports von Stoffwechselprodukten können neu geschaffene Gewebeverbände nicht

vollständig in umliegendes Gewebe integriert werden, was häufig dessen Untergang bedeutet (Hoang, 2009). Hierzu ist es notwendig, dem zu transplantierenden Gewebe eine definierte und konstante Blutversorgung zu ermöglichen, über welche der Stoffaustausch erfolgen kann. Auch wenn Knorpel ein avaskuläres Gewebe ist und nur aus Chondrozyten besteht, welche in einer Matrix aus Kollagen und Proteoglykanen eingebettet ist, benötigen neu gezüchtete Knorpelverbände mit einer großen Zellzahl eine hyperoxische Umgebung für Wachstum und Differenzierung (Staudenmaier, 2004b). Eine Unterbrechung von Blutfluss und Nährstoffversorgung führt zu Zelltod und Nekrosen der Knorpelkonstrukte mit nachfolgendem Verlust von Form und Funktion (Hoang, 2009). Um diese hyperoxische Umgebung zu schaffen bedarf es bei primär avaskulärem Gewebe wie Knorpel einer Neovaskularisation des eingebrachten Gewebeverbandes (Feucht, 2011). Durch eine Vergrößerung des Kapillarbettes vor einer möglichen Transplantation des tissue-engineerten Gewebeverbandes kann die Überlebensrate des Transplantats deutlich erhöht werden.

In den meisten der bisherigen Studien wurden besiedelte Konstrukte subkutan oder intramuskulär in das Versuchstier eingebracht, eine Neovaskularisation erfolgte langsam von außen durch das umliegende Gewebe (Baek, 2006). Dieses Vorgehen hat eine verstärkte Neovaskularisation der Konstruktränder, aber nur eine geringe Penetration der Gefäße in die Mitte des Konstrukts zur Folge, wodurch es hier zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und anderen Substraten kommen kann. Unterstützt wird dieses Vorgehen in einigen Studien durch Förderung der natürlichen Angiogenese, vor allem durch Wachstumsfaktoren wie VEGF oder TGF- β (Blunk, 2002). Dennoch bedarf es gerade für größere Konstrukte einer definierten Blutversorgung auch im Inneren. Dies kann durch die Präfabrikation des tissue-engineerten Knorpelverbandes erreicht werden. Präfabrikation im eigentlichen Sinne bedeutet die Einführung einer neuen Gefäßversorgung in einem Gewebeverband, der sonst in seiner Blutversorgung limitiert wäre (Neumeister, 2006). Dies kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden, unter anderem durch

Wachstumsfaktoren der Angiogenese oder durch die Insertion eines Gefäßstiels (Neumeister, 2006), wie es in der vorliegenden Studie erfolgte. Bei Insertion eines axialen Gefäßbündels in mit Chondrozyten besiedelte Polyurethankonstrukte wie den unseren erfolgt nach 3 bis 4 Wochen eine ausreichende Aussprossung kleinerer Gefäße, um das Konstrukt vaskulär suffizient zu integrieren (Staudenmaier, 2004b). Nach Ablauf dieser Zeit kann eine Transposition des nun vaskularisierten Konstruktes an den gewünschten Ort erfolgen, vorausgesetzt, das zentrale Gefäß verfügt über einen Anschluss an das Blutsystem. Bei erfolgter Vaskularisation kann, je nach geplanter Anwendung, das zentrale Gefäß sowohl endständig ligiert werden, um als gestieltes Transplantat eingesetzt zu werden, als auch weiterhin als Durchflußgefäß bestehen bleiben, wenn keine Transposition erforderlich ist. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass es in diesem Mausmodell keine Unterschiede hinsichtlich Knorpelqualität oder Zellzahl bei endständiger Ligatur oder belassenem Durchflußsystem gibt (Mandlik, 2008). Hoang konnte hingegen anhand verschiedener Gefäßstielmodelle in Versuchen an Kaninchen einen Vorteil mikrovaskulärer arterio-venöser Anastomosen im Vergleich zu einer endständigen Ligatur nachweisen (Hoang, 2009), was allerdings aufgrund der kleineren Anatomie im Mausmodell praktisch nur schwer umzusetzen wäre. Eine endständige Ligatur bietet aber auch eine einfache Möglichkeit eines gestielten Transfers in andere Regionen des Körpers und damit eine weitaus höhere Praktikabilität für chirurgisch-rekonstruktive Anwendungen. Allerdings kommt es bei ligierten und transponierten gefäßgestielten Konstrukten zu einem Defekt an der Entnahmestelle und damit möglicherweise zu trophischen Störungen im ehemals von diesem Gefäß versorgten Gebiet, auch wenn in unseren Versuchsreihen die Tiere keinerlei Einschränkungen aufzeigten.

5.3 Knorpelqualität und vaskuläre Integration

Unsere Versuche beinhalteten in jedem Versuchstier sowohl ein Konstrukt mit Gefäßanschluss als auch eine Kontrolle auf der Gegenseite, welche nur mit einer Silikonfolie abgeschirmt war, jedoch keinen Kontakt zu Gefäßen hatte. Die Ergebnisse dieser Kontrollen ohne Gefäßanschluss spiegelten die

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wieder, die das Wachstum autologer Chondrozyten *in vivo* in einer synthetischen, porösen Matrix untersucht hatten (Haisch, 2002, Baek, 2006, Eyrich, 2007b). In den histologischen Färbungen zeigte sich in den Kontrollen zwar nur eine geringe Zellzahl, jedoch mit typischer chondrozytärer, lakunärer Struktur (Abb. 5,8,11,14). In den für Glykosaminoglykanen spezifischen Färbungen Alcian-Blau und Safranin-O zeigte sich darüber hinaus eine intensive Anfärbung um die Chondrozyten herum, was für eine Ausbildung knorpeltypischer extrazellulärer Matrix spricht (Abb. 11, 14). Baek und Eyrich beschrieben ebenfalls eine Zunahme des Gehalts an Glykosaminoglykanen mit zunehmender Kultivierungsdauer *in vivo* (Baek, 2006, Eyrich, 2007b). Dies ließ sich in den vorliegenden Untersuchungen nachvollziehen. Kontrollen, welche 9 Wochen *in vivo* belassen wurden, zeigten eine intensivere Anfärbung auf Glykosaminoglykane als diejenigen, die 4 Wochen *in vivo* belassen wurden (Abb. 11, 14). In den quantitativen Untersuchungen konnte diese Zunahme an Glykosaminoglykanen mit zunehmender Verweildauer *in vivo* bestätigt werden, hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen beider Gruppen (Tab. 5, $p=0,007$). Darüber hinaus konnte ein (jedoch nicht statistisch signifikanter) Anstieg der Zellzahl mit zunehmender Zeit *in vivo* beobachtet werden (Tab. 4, $p=0,197$). Die meisten vorherigen Studien verzichteten in derartigen *in vivo*-Studien auf eine Abschirmung der Konstrukte durch z.B. eine Silikonfolie, die in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der Fragestellung bezüglich der Neovaskularisation notwendig war. Dennoch waren die Ergebnisse mit den vorangegangenen Studien vergleichbar (Baek, 2006, Eyrich, 2007b), auch zeigte sich makroskopisch kein vermehrt durch die an den Nahtenden befindlichen Öffnungen der Abschirmung einwachsendes Gewebe. Dies lässt vermuten, dass nicht nur der direkte Kontakt mit umliegendem Gewebe Zellwachstum und Matrixproduktion unterstützen, sondern dass die Lage *in vivo* selbst eine Art Bioreaktor für die Konstrukte darstellt.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Gefäßversorgung tissue-engineerten Knorpelgewebes beschäftigen. Zahlreiche Autoren weisen auf

die Problematik hin, dass häufig nur an den äußeren Bereich von tissue-engineerten Knorpelkonstrukten ein gutes Gewebewachstum zu erreichen ist (Alini, 2003, Lee, 2005). Dies wird teilweise auf die Limitationen der Diffusion als einzige Nährstoffquelle der Konstrukte zurückgeführt (Lee, 2005). Mandlik konnte zeigen, dass eine axiale Insertion von blutführenden Gefäßen ein homogenes Wachstum des Knorpelgewebes im gesamten Konstrukt ermöglichen kann (Mandlik, 2008). In der vorliegenden Studie wurde in den Verum-Gruppen das femorale Gefäßbündel der Versuchstiere mitten durch das vorher angeschnittene Konstrukt gelegt und anschließend longitudinal mit einer Silikonfolie gegen einwachsendes Gewebe abgeschirmt. Nach Staudenmaier und Nguyen ist in diesem Mausmodell nach 3 Wochen die vaskuläre Intergration des Konstruktes durch Gefäßaussprossungen abgeschlossen (Staudenmaier, 2004b, Nguyen, 2005). Da für einen klinischen Einsatz eine Transposition des neovaskularisierten Konstruktes an andere Lokalisationen wichtig ist, führten wir nach besagten 3 Wochen die endständige Ligatur des Gefäßbündels durch und schwenkten das Konstrukt nach kranial in eine vorpräparierte, subkutane Bauchtasche. Die histologischen Untersuchungen zeigten starkes Zellwachstum sowie deutlich mehr extrazelluläre Matrix im gesamten Konstrukt (Abb. 6,7,9,10,12,13,15,16) als in den Kontrollgruppen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die Mandlik sowohl im Durchflussmodell als auch in einem Modell mit endständiger Ligatur beschrieben hatte (Mandlik, 2008). In den quantitativen Untersuchungen ließ sich ein (allerdings statistisch nicht signifikant) höherer Gehalt an DNA in den gefäß-inserierten Konstrukten feststellen, welche 9 Wochen in vivo verblieben waren (Tab. 4, $p=0,073$). Hier zeigt sich, dass sich das Nährstoffangebot im Inneren der Konstrukte durch die Gefäßinsertion deutlich verbessert, so dass nicht ausschließlich die Randbereiche ein hohes Gewebewachstum verzeichnen können, wie es ohne definierte Blutversorgung geschehen kann (Alini, 2003, Lee, 2005). Die Glykosaminoglykan-spezifischen Färbungen Alcian-Balu und Safranin O zeigten jedoch, dass die Zunahme an extrazellulärer Matrix nicht auf der Synthese knorpeltypischen Kollagens beruhte (Abb. 12,13,15,16). Vor allem in Gruppe 2, aber auch in Gruppe 1 zeigte sich in Gefäßnähe viel faserreiches

Bindegewebe und reichlich Zellen, jedoch kaum noch knorpeltypische Matrix. In den einzelnen Konstruktoren bildete sich eine Schichtung heraus, mit einem glykosaminreichem Zentrum, deren Zellen noch lakunäre Form aufwies, und einem Randsaum aus faserreichem Bindegewebe, in dem kaum noch knorpeltypische, extrazelluläre Matrix vorherrschte (Abb. 13, 16). Analog hierzu ergaben die quantitativen Untersuchungen auf den Gehalt an Glykosaminoglykanen einen statistisch signifikanten Abfall der Konzentration mit zunehmender Dauer *in vivo* (Abb. 5, $P=0,048$). Somit ist bei den Konstrukten mit Gefäßanschluss von einer Entdifferenzierung hin zu faserigem Bindegewebe auszugehen, welche sich mit zunehmender Dauer *in vivo* verstärkt. Ähnliches hatte sich bereits in Voruntersuchungen gezeigt (Mandlik, 2008), wenn auch nicht so deutlich ausgeprägt wie in dieser Studie. Dagegen berichtet Nguyen in seinen Experimenten zur Neovaskularisation tissue-engineerter Knorpelkonstrukte im Kaninchenmodell von einer guten hyalinen Struktur innerhalb des Konstruktes, ebenso wurde dort keine Schichtung innerhalb der Konstrukte beschrieben (Hoang, 2009). Auch Staudenmaier beschreibt eine hyaline Knorpelstruktur ohne eine derartige Entdifferenzierungstendenz (Staudenmaier, 2004b). Beide Studien wurden jedoch am Kaninchenmodell durchgeführt. Die starke Zellproliferation in den Verum-Gruppen zeigt, dass die Sauerstoff- und Substratversorgung ausreichend war, um ein Gewebewachstum zu unterhalten. Ein möglicher Erklärungsansatz für die dennoch stattfindende Entdifferenzierung ist, dass durch eine zu enge Nachbarschaft mit Gefäßen und einem damit einhergehenden Überangebot an nutritiver Versorgung das prinzipiell bradytrophe Knorpelgewebe zu einer Entwicklung hin zu Fibroblasten veranlasst, die besser auf ein solches Überangebot eingestellt sind (Benya, 1982). Andererseits könnte ebenfalls die zu starke Zellvermehrung eine Ursache sein, die zu einer für Knorpelverhältnisse zu hohen Zelldichte führen könnte. Zell-Matrix-Kontakte stellen für Knorpelgewebe einen starken Differenzierungsanreiz dar (Chung, 2008). Bei einem Überwiegen von Zell-Zell-Kontakten ohne ausreichende perizelluläre Matrix könnte sich dies ebenfalls negativ auf die Chondrogenese auswirken. Ebenfalls ist es möglich, dass der Blutfluss mit zunehmender Zeit nach endständiger Ligatur und

Transposition aufgrund von Gefäßspasmen oder Thrombosierungen abnahm. Dies würde erklären, weshalb in Studien am Kaninchenmodell, in welchem aufgrund der größeren Anatomie die Gefäße tolerabler gegenüber Schädigung sind, keine solchen Entdifferenzierungen beobachtet wurden (Staudenmaier, 2004b, Hoang, 2009). Auch ist das endständige Ligaturmodell anfällig für Hypoperfusionen, weswegen Nguyen anhand verschiedener getesteter Gefäßkonfigurationen eine mikrovaskuläre Anastomose gegenüber einer endständigen Ligatur empfiehlt (Hoang, 2009). Allerdings müsste eine solche Unterbrechung der Blutversorgung alle Zellen betreffen, was aufgrund der steigenden Zellzahl mit zunehmender Liegedauer eher unwahrscheinlich ist. Ebenfalls auffällig ist, dass sowohl in den histologischen Färbungen, als auch in den quantitativen Analysen die Konstrukte mit Gefäßanschluss der Gruppe 1 mehr hyaline Knorpelsubstanz aufwiesen als ihre jeweiligen Kontrollen. Erst nach 9 Wochen (Gruppe 2) zeigte sich diese Entdifferenzierung hin zu faserigem Bindegewebe. Dies könnte neben der reinen Verweildauer *in vivo* für eine Schädigung durch die Transposition sprechen, da die Konstrukte der Gruppe eins nach Transposition nur eine Woche im Versuchstier verblieben und somit vielleicht noch genug Reserven hatten, sich gegen den ursächlich schädigenden Mechanismus zu behaupten. Dagegen spricht die gute Neovaskularisierung, die sich nach 3 Wochen einstellte, und die noch im Durchflussmodell erfolgte. Gefäßeinsprossungen konnten sowohl um das zentral inserierte Gefäß herum, als auch in einzelnen Konstruktporen weiter distal des Gefäßes nachgewiesen werden (Abb. 17,18). Dies zeigt dass das Mausmodell mit zentral inseriertem Gefäß eine ausreichende vaskuläre Integration eines tissue-engineerten Gewebes ermöglichen kann, wie es in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte (Mandlik, 2008). Um jedoch für klinische Anwendungen sinnvoll einsetzbar zu sein, muss die Entdifferenzierung des Knorpelgewebes unbedingt verhindert werden. Hier sind sicherlich weitere Studien erforderlich, um diese Problematik genauer zu beleuchten.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Gefäßversorgung auch für bradytrophe Gewebe wie Knorpel einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen leisten kann. Das hier verwendete Mausmodell ist gut etabliert und einfach in der Handhabung. Ähnliche Versuchsaufbauten mit verschiedenen Zellarten, Matrizen oder der Einsatz von Wachstumsfaktoren und ähnlichen Substanzen bieten die Möglichkeit, weiteres Verbesserungspotenzial bei der Züchtung qualitativ möglichst hochwertigen Knorpels oder anderen Gewebes aufzuzeigen. Ebenfalls können in größeren Tiermodellen mikrovaskulär-anastomosierte Gefäßstielimplantationen untersucht werden. Auch in der Befüllung der Konstrukte gibt es noch Verbesserungsmöglichkeiten, beispielsweise durch dynamisches Zell-Seeding, das eine effizientere Verteilung der Zellen in der Trägerstruktur ermöglicht (Vunjak-Novakovic, 1998). Weiterhin finden Bioreaktoren zunehmend Eingang in in vitro Kultivierungsstrategien, die Knorpelzellen möglichst natürliche Kulturbedingungen bieten können (Freed, 1998). Neuartige Trägermaterialien, welche sowohl die Stabilität synthetischer Matrizen als auch die Interaktivität biologischer Materialien verbinden (Chung, 2008), wären ein weiterer Schritt in dem Bestreben, möglichst naturgetreuen Knorpel züchten zu können. Durch die stetige Fortentwicklung der Methoden erscheint ein baldiger Einsatz tissue-engineerter Gewebe im Rahmen rekonstruktiver Eingriffe im Kopf-Hals-Bereich in absehbarer Zeit möglich. In einigen Bereichen, wie beispielsweise der Orthopädie, ist die Transplantation autologer Chondrozyten bereits in klinischen Versuchsreihen gemündet (Brittberg, 1994). Daher muss auch für den Einsatz in der rekonstruktiven Chirurgie das Ziel der Eingang in die klinische Praxis sein.

6 Zusammenfassung

In der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie besteht ein ständig steigender Bedarf an Ersatz für Defekte des formgebenden Strukturknorpels, die durch Traumata, Tumoren oder sonstige Erkrankungen verursacht werden können (Verwoerd-Verhoef, 1998). Knorpelgewebe stellt aufgrund seiner Avaskularität und der damit verbundenen schlechten Regenerationsfähigkeiten (Campbell, 1969) besondere Herausforderungen bezüglich eines Ersatzes. Als neuer möglicher Therapieansatz hat sich in den letzten Jahren das Tissue Engineering erwiesen, mit dem auch kleinere Mengen entnommenen Materials durch in vitro Vervielfältigung ausreichen können, um größere Defekte zu verschließen (Langer, 1993). Eine besondere Herausforderung stellt die ausreichende nutritive Versorgung des zu implantierenden Gewebeverbandes dar.

Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Studie dreidimensionale Polyurethankonstrukte mit Chondrozyten aus humanem Nasenseptumknorpel besiedelt und um die Femoralgefäße immuninkompetenter Nacktmäuse geschlungen, um so ein Einsprossen neuer Gefäße aus dem inserierten Gefäß zu ermöglichen und das Konstrukt vaskulär zu integrieren. Nach einer definierten Einheilungszeit von 3 Wochen, nach der in aller Regel die Neovaskularisation abgeschlossen ist (Staudenmaier, 2004b), wurden die Gefäße distal ligiert und das Konstrukt nun im Sinne eines gestielten Lappens in die freigelegte Bauchtasche der Tiere transponiert. Dort wurden die Konstrukte für eine Woche (Gruppe 2) oder 6 Wochen (Gruppe 2) belassen. Anschließend erfolgte die histologische und quantitative biochemische Auswertung der explantierten Konstrukte. Hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Zellzahl durch die Insertion des Gefäßstiels und eine längere Liegezeit in vivo. Allerdings ging dies zu Lasten der Qualität des gezüchteten Knorpels, im Sinne einer Entdifferenzierung des vormals hyalinen Gewebes hin zu faserartigem Bindegewebe.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Neovaskularisation mittels Präfabrikation auch bei bradytrophem Gewebe wie Knorpel einen wichtigen Beitrag zur

Schaffung funktionaler Gewebeverbände leisten kann, und dass das Modell auch für die örtliche Transposition geeignet ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abbase, E. A., Shenaq, S. M., Spira, M., el-Falaky, M. H.
Prefabricated flaps: Experimental and clinical review.
Plast. Reconstr. Surg. 96 (1995) 1218-1225
- Alini, M., Li, W., Markovic, P., Aebi, M., Spiro, R. C., Roughley, P. J.
The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix.
Spine (Phila Pa 1976) 28 (2003) 446-454; discussion 453
- Auger, F. A., Lopez Valle, C. A., Guignard, R., Tremblay, N., Noel, B., Goulet, F., Germain, L.
Skin equivalent produced with human collagen.
In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 31 (1995) 432-439
- Baek, C. H., Ko, Y. J.
Characteristics of tissue-engineered cartilage on macroporous biodegradable PLGA scaffold.
Laryngoscope 116 (2006) 1829-1834
- Barrilleaux, B., Phinney, D. G., Prockop, D. J., O'Connor, K. C.
Review: Ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells.
Tissue Eng. 12 (2006) 3007-3019
- Bell, E., Ivarsson, B., Merrill, C.
Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (1979) 1274-1278
- Benya, P. D., Shaffer, J. D.
Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.
Cell 30 (1982) 215-224
- Bhardwaj, T., Pilliar, R. M., Grynblas, M. D., Kandel, R. A.
Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro.
J. Biomed. Mater. Res. 57 (2001) 190-199
- Bisceglie, V.
Über die antineoplastische immunität: Heterologe einpflanzung von tumoren in hühnerembryonen.
Ztschr. f. Krebsforsch. 40 (1933) 122-140

Blunk, T., Sieminski, A. L., Gooch, K. J., Courter, D. L., Hollander, A. P., Nahir, A. M., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L. E.
Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage.
Tissue Eng. 8 (2002) 73-84

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

Bryant, S. J., Anseth, K. S.
Hydrogel properties influence ecm production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels.
J. Biomed. Mater. Res. 59 (2002) 63-72

Bryant, S. J., Bender, R. J., Durand, K. L., Anseth, K. S.
Encapsulating chondrocytes in degrading peg hydrogels with high modulus: Engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production.
Biotechnol. Bioeng. 86 (2004) 747-755

Bujia, J., Sittinger, M., Pitzke, P., Wilmes, E., Hammer, C.
Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture.
ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 55 (1993) 347-351

Burke, J. F., Yannas, I. V., Quinby, W. C., Jr., Bondoc, C. C., Jung, W. K.
Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury.
Ann. Surg. 194 (1981) 413-428

Campbell, C. J.
The healing of cartilage defects.
Clin Orthop Relat Res 64 (1969) 45-63

Caplan, A. I.
Mesenchymal stem cells.
J Orthop Res 9 (1991) 641-650

Cheers, C., Waller, R.
Activated macrophages in congenitally athymic "Nude mice" And in lethally irradiate mice.
J. Immunol. 115 (1975) 844-847

Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Ochiai, N., Tateishi, T.
Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen.
Tissue Eng. 10 (2004) 323-330

- Chick, W. L., Like, A. A.,Lauris, V.
Beta cell culture on synthetic capillaries: An artificial endocrine pancreas.
Science 187 (1975) 847-849
- Chung, C.,Burdick, J. A.
Engineering cartilage tissue.
Adv Drug Deliv Rev 60 (2008) 243-262
- Chung, C., Mesa, J., Miller, G. J., Randolph, M. A., Gill, T. J.,Burdick, J. A.
Effects of auricular chondrocyte expansion on neocartilage formation in
photocrosslinked hyaluronic acid networks.
Tissue Eng. 12 (2006) 2665-2673
- Cima, L. G., Langer, R.,Vacanti, J. P.
Polymers for tissue and organ culture.
J. Bioact. Compat. Polym. 6 (1991) 232-239
- Coleman, R. M., Case, N. D.,Guldborg, R. E.
Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth
factors.
Biomaterials 28 (2007) 2077-2086
- De Franceschi, L., Grigolo, B., Roseti, L., Facchini, A., Fini, M., Giavaresi, G., Tschon,
M.,Giardino, R.
Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage
defects in rabbits.
J Biomed Mater Res A 75 (2005) 612-622
- DeLisser, H. M., Newman, P. J.,Albelda, S. M.
Molecular and functional aspects of pecam-1/cd31.
Immunol. Today 15 (1994) 490-495
- Deuel, T. F.,Chang, Y.
Growth factors.
In "Principles of tissue engineering", R. P. Lanza, R. Langer,J. P. Vacanti, Academic
Press, London, 2007, 193-206
- Diamond, D. A.,Caldamone, A. A.
Endoscopic treatment of vesicoureteric reflux in children using autologous
chondrocytes.
American Association of Pediatrics Annual Meeting 1998, San Francisco, CA, USA,
Abstract 107: 176-177
- Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R.,Prockop, D. J.
Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple
colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate
and differentiate.
Br. J. Haematol. 107 (1999) 275-281

Eyrich, D., Brandl, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., Staudenmaier, R., Goepferich, A., Blunk, T.

Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering.
Biomaterials 28 (2007a) 55-65

Eyrich, D., Wiese, H., Maier, G., Skodacek, D., Appel, B., Sarhan, H., Tessmar, J., Staudenmaier, R., Wenzel, M. M., Goepferich, A., Blunk, T.

In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds.

Tissue Eng. 13 (2007b) 2207-2218

Farndale, R. W., Buttle, D. J., Barrett, A. J.

Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.

Biochim. Biophys. Acta 883 (1986) 173-177

Farndale, R. W., Sayers, C. A., Barrett, A. J.

A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures.

Connect. Tissue Res. 9 (1982) 247-248

Feucht, A., Hoang, N. T., Hoehnke, C., Hien, P. T., Mandlik, V., Storck, K., Staudenmaier, R.

[neovascularisation and free microsurgical transfer of cartilage-engineered constructs].

HNO 59 (2011) 239-247

Freed, L. E., Hollander, A. P., Martin, I., Barry, J. R., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system.

Exp. Cell Res. 240 (1998) 58-65

French, M. M., Rose, S., Canseco, J., Athanasiou, K. A.

Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts.

Ann. Biomed. Eng. 32 (2004) 50-56

Fuchs, J. R., Nasser, B. A., Vacanti, J. P.

Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction.

Ann. Thorac. Surg. 72 (2001) 577-591

Germann, G., Pelzer, M., Sauerbier, M.

[prefabricated flaps, a new reconstructive concept].

Orthopade 27 (1998) 451-456

Gershwin, M. E., Merchant, B., Gelfand, M. C., Vickers, J., Steinberg, A. D., Hansen, C. T.

The natural history and immunopathology of outbred athymic (nude) mice.

Clin. Immunol. Immunopathol. 4 (1975) 324-340

Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Sadick, H., Baisch, A., Hormann, K., Riedel, F.
In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes.

Otolaryngol. Head Neck Surg. 134 (2006a) 510-515

Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Sadick, H., Baisch, A., Hormann, K., Riedel, F.
In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes.

Otolaryngol. Head Neck Surg. 134 (2006b) 510-515

Grad, S., Kupcsik, L., Gorna, K., Gogolewski, S., Alini, M.

The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: Potential and limitations.

Biomaterials 24 (2003) 5163-5171

Green, W. T., Jr.

Behavior of articular chondrocytes in cell culture.

Clin Orthop Relat Res 75 (1971) 248-260

Grikscheit, T. C., Vacanti, J. P.

The history and current status of tissue engineering: The future of pediatric surgery.

J. Pediatr. Surg. 37 (2002) 277-288

Guelcher, S. A.

Biodegradable polyurethanes: Synthesis and applications in regenerative medicine.

Tissue Eng Part B Rev 14 (2008) 3-17

Haisch, A., Klaring, S., Groger, A., Gebert, C., Sittinger, M.

A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants.

Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 259 (2002) 316-321

Hasui, M., Saikawa, Y., Miura, M., Takano, N., Ueno, Y., Yachie, A., Miyawaki, T., Taniguchi, N.

Effector and precursor phenotypes of lymphokine-activated killer cells in mice with severe combined immunodeficiency (scid) and athymic (nude) mice.

Cell. Immunol. 120 (1989) 230-239

Hoang, N. T., Hoehnke, C., Hien, P. T., Mandlik, V., Feucht, A., Staudenmaier, R.

Neovascularization and free microsurgical transfer of in vitro cartilage-engineered constructs.

Microsurgery 29 (2009) 52-61

Hoang, N. T., Kloeppe, M., Staudenmaier, R., Werner, J., Biemer, E.

Prefabrication of large fasciocutaneous flaps using an isolated arterialised vein as implanted vascular pedicle.

Br. J. Plast. Surg. 58 (2005) 632-639

Huang, J. I., Kazmi, N., Durbhakula, M. M., Hering, T. M., Yoo, J. U., Johnstone, B.
Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison.

J. Orthop. Res. 23 (2005) 1383-1389

Hutmacher, D. W., Ng, K. W., Kaps, C., Sittinger, M., Klaring, S.

Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier.

Biomaterials 24 (2003) 4445-4458

Hwang, N. S., Kim, M. S., Sampattavanich, S., Baek, J. H., Zhang, Z., Elisseeff, J.

Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells.

Stem Cells 24 (2006) 284-291

Ismail, J. A., Poppa, V., Kemper, L. E., Scatena, M., Giachelli, C. M., Coffin, J. D., Murry, C. E.

Immunohistologic labeling of murine endothelium.

Cardiovasc Pathol 12 (2003) 82-90

Junqueira, I. C., Carneiro, J.

Knorpelgewebe.

In "Histologie", M. Gratzl, Springer Verlag, Berlin, 2005, 5. Auflage, 82-89

Kafienah, W., Jakob, M., Demarteau, O., Frazer, A., Barker, M. D., Martin, I., Hollander, A. P.

Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: Comparison of adult nasal and articular chondrocytes.

Tissue Eng. 8 (2002a) 817-826

Kafienah, W., Jakob, M., Demarteau, O., Frazer, A., Barker, M. D., Martin, I., Hollander, A. P.

Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: Comparison of adult nasal and articular chondrocytes.

Tissue Eng. 8 (2002b) 817-826

Kellner, K., Schulz, M. B., Gopferich, A., Blunk, T.

Insulin in tissue engineering of cartilage: A potential model system for growth factor application.

J. Drug Target. 9 (2001) 439-448

Khouri, R. K., Ozbek, M. R., Hruza, G. J., Young, V. L.

Facial reconstruction with prefabricated induced expanded (pie) supraclavicular skin flaps.

Plast. Reconstr. Surg. 95 (1995) 1007-1015; discussion 1016-1007

Khoury, R. K., Upton, J., Shaw, W. W.
Principles of flap prefabrication.
Clin. Plast. Surg. 19 (1992) 763-771

Kim, Y. J., Sah, R. L., Doong, J. Y., Grodzinsky, A. J.
Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using hoechst 33258.
Anal. Biochem. 174 (1988) 168-176

Langer, R., Vacanti, J. P.
Tissue engineering.
Science 260 (1993) 920-926

Lee, C. R., Grad, S., Gorna, K., Gogolewski, S., Goessl, A., Alini, M.
Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: A preliminary analysis.
Tissue Eng. 11 (2005) 1562-1573

Luo, Y., Engelmayer, G., Auguste, D. T., da Silva Ferreira, L., Karp, K. M., Saigal, R., Langer, R.
Three-dimensional scaffolds.
In "Principles of tissue engineering", R. P. Lanza, R. Langer, J. P. Vacanti, Academic Press, London, 2007, 359-373

Mandlik, V., Nguyen, T. H., Wiese, H., Staudenmaier, R.
Präfabrikation tissue-engineerter knorpelkonstrukte im mausmodell.
79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie 2008, Bonn,

Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Bhawal, U. K., Tsuji, K., Nakamura, K., Kato, Y.
Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: Differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells.
J. Bone Miner. Res. 20 (2005) 399-409

Mauck, R. L., Yuan, X., Tuan, R. S.
Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture.
Osteoarthritis Cartilage 14 (2006) 179-189

Mayhew, T. A., Williams, G. R., Senica, M. A., Kuniholm, G., Du Moulin, G. C.
Validation of a quality assurance program for autologous cultured chondrocyte implantation.
Tissue Eng. 4 (1998) 325-334

Morrison, W. A., Penington, A. J., Kumta, S. K., Callan, P.

- Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps.
Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997) 378-385
- Neumeister, M. W., Wu, T., Chambers, C.
Vascularized tissue-engineered ears.
Plast. Reconstr. Surg. 117 (2006) 116-122
- Nguyen, T. H., Kloepfel, M., Staudenmaier, R., Werner, J., Biemer, E.
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 (2005) 326-333
- Prockop, D. J., Gregory, C. A., Spees, J. L.
One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 Suppl 1 (2003) 11917-11923
- Rao, G. R., Rawls, W. E., Perey, D. Y., Tompkins, W. A.
Macrophage activation in congenitally athymic mice raised under conventional or germ-free conditions.
J. Reticuloendothel. Soc. 21 (1977) 13-20
- Rosier, R. N., O'Keefe, R. J., Crabb, I. D., Puzas, J. E.
Transforming growth factor beta: An autocrine regulator of chondrocytes.
Connect. Tissue Res. 20 (1989) 295-301
- Rygaard, J.
Thymus and self, immunobiology of the mouse mutant nude
Wiley, London-New York, 1973,
- Scherer, K., Schunke, M., Sellckau, R., Hassenpflug, J., Kurz, B.
The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro.
Biorheology 41 (2004) 323-333
- Sittinger, M., Bujia, J., Rotter, N., Reitzel, D., Minuth, W. W., Burmester, G. R.
Tissue engineering and autologous transplant formation: Practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques.
Biomaterials 17 (1996) 237-242
- Solchaga, L. A., Temenoff, J. S., Gao, J., Mikos, A. G., Caplan, A. I., Goldberg, V. M.
Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds.
Osteoarthritis Cartilage 13 (2005) 297-309
- Staudenmaier, R., Hoang, T. N., Kleinsasser, N., Schurr, C., Frolich, K., Wenzel, M. M., Aigner, J.
Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage.
J. Reconstr. Microsurg. 20 (2004a) 555-564

Staudenmaier, R., Hoang, T. N., Kleinsasser, N., Schurr, C., Frolich, K., Wenzel, M. M., Aigner, J.

Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage.
J. Reconstr. Microsurg. 20 (2004b) 555-564

Terada, S., Yoshimoto, H., Fuchs, J. R., Sato, M., Pomerantseva, I., Selig, M. K., Hannouche, D., Vacanti, J. P.

Hydrogel optimization for cultured elastic chondrocytes seeded onto a polyglycolic acid scaffold.
J Biomed Mater Res A 75 (2005) 907-916

Vacanti, J. P., Langer, R.

Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation.
Lancet 354 Suppl 1 (1999) S132-34

Vacanti, J. P., Langer, R., Upton, J., Marler, J. J.

Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration.
Adv Drug Deliv Rev 33 (1998) 165-182

Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., Langer, R.

Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices.
J. Pediatr. Surg. 23 (1988) 3-9

Veilleux, N., Spector, M.

Effects of fgf-2 and igf-1 on adult canine articular chondrocytes in type ii collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro.
Osteoarthritis Cartilage 13 (2005) 278-286

Verwoerd-Verhoef, H. L., ten Koppel, P. G., van Osch, G. J., Meeuwis, C. A., Verwoerd, C. D.

Wound healing of cartilage structures in the head and neck region.
Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 43 (1998) 241-251

von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., Muller, P.

Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.
Nature 267 (1977) 531-532

von der Mark, K., Gluckert, K.

[biochemical and molecular biologic aspects of early detection of human arthroses].
Orthopade 19 (1990) 2-15

Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I., Bursac, P. M., Langer, R., Freed, L. E.

Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering.
Biotechnol. Prog. 14 (1998) 193-202

Waldman, S. D., Couto, D. C., Grynblas, M. D., Pilliar, R. M., Kandel, R. A.
A single application of cyclic loading can accelerate matrix deposition and
enhance the properties of tissue-engineered cartilage.
Osteoarthritis Cartilage 14 (2006) 323-330

Wlodarski, K., Morrison, K., Rose, N. R.
Effects of nu gene on the numbers of mast cells in lymph nodes.
Scand. J. Immunol. 15 (1982) 105-108

Zielinski, B. A., Lysaght, M. J.
Immunoisolation.
In "Principles of tissue engineering", R. P. Lanza, R. Langer, J. P. Vacanti, Academic
Press, London, 2007, 399-404

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z.
C., Fraser, J. K., Benhaim, P., Hedrick, M. H.
Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.
Mol. Biol. Cell 13 (2002) 4279-4295

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P.,
Lorenz, H. P., Hedrick, M. H.
Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based
therapies.
Tissue Eng. 7 (2001) 211-228

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. R. Staudenmaier für die Überlassung des interessanten Themas und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der HNO-Forschung, sowie für zahlreiche hilfreiche Anmerkungen und Verbesserungen.

Herrn Dr. med. M. Burghartz gilt mein spezieller Dank für die ständige kompetente Betreuung dieser experimentellen Untersuchung und seine große Hilfsbereitschaft und Geduld.

Für alle Fragen der Zellkulturtechniken und Färbungen sowie bei nahezu sämtlichen Laborabläufen stand mir Frau Anne Hills stets hilfreich zur Seite, wofür ich mich hiermit ausdrücklich bedanken möchte.

Mein Dank gilt ebenso der gesamten Arbeitsgruppe „Tissue Engineering“ für die freundliche Aufnahme, angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfestellung bei allen auftretenden Problemen während der Versuche.