

**Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf
kultivierte humane Chondrozyten**

**Philipp Christian Jürgens
2003**

Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. (UMF Temeschburg) H.-H. Horch)

**Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf
kultivierte humane Chondrozyten**

Philipp Christian Jürgens

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dr. H.-F. Zeilhofer,
Universität Basel, Schweiz
2. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Die Dissertation wurde am 27.03.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	IV
1. Einleitung.....	1
2. Problemstellung.....	2
2.1. Gewebetransplantation im Kopf-Hals-Bereich	2
2.1.1. Autologe Transplantate	2
2.1.2. Homologe Transplantate	3
2.1.3. Heterologe Transplantate.....	4
2.1.4. Alloplastische Materialien.....	4
2.2. Knorpelgewebe	5
2.2.1. Histologie.....	5
2.2.2. Interzellulärsubstanz	5
2.2.3. Formen des Knorpelgewebes.....	6
2.2.3.1. Hyaliner Knorpel	6
2.2.3.2. Elastischer Knorpel.....	7
2.2.3.3. Faserknorpel.....	7
2.2.4. Knorpelwachstum.....	7
2.3. Gewebezüchtung	8
2.4. Auswirkungen elektromagnetischer Strahlung.....	11
2.4.1. Formen elektromagnetischer Strahlung	11
2.4.2. Epidemiologische Studien	12
2.4.3. Tierexperimentelle Studien.....	13
2.4.4. Elektromagnetische Felder und Knochenheilung	13
2.4.5. Einwirkungen von extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldern auf Zellsysteme	13
3. Ziel der Arbeit	15
4. Material und Methoden.....	16
4.1. Material	16
4.1.1. Chemikalien.....	16
4.1.2. Histologie.....	17
4.1.2.1. Immunhistochemie.....	17
4.1.3. Medium und Zusätze	18
4.1.4. Testsysteme für Zellproliferation und Kollagensynthese	18

4.1.4.1. Zell-Proliferations-ELISA, BrdU (colorimetric).....	18
4.1.4.2. Sirius Red Collagen ELISA.....	18
4.1.5. Geräte	19
4.1.6. Kulturschalen und Filter.....	19
4.2. Methoden.....	21
4.2.1. Magnetbefeldung.....	21
4.2.2. Zellkulturtechniken	22
4.2.2.1. Gewinnung des Knorpelgewebes	22
4.2.2.2. Chondrozytenisolierung	23
4.2.2.3. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	23
4.2.2.4. Ansatz der Monolayerkultur	23
4.2.2.5. Kryokonservierung humaner Chondrozyten.....	25
4.2.3. Messung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA und BrdU-Färbung	25
4.2.4. Quantitative Bestimmung des löslichen Kollagens im Kulturüberstand mittels Kollagen-Assay.....	26
4.2.5. Histochemie.....	28
4.2.5.1. Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase Immunhistochemie.....	28
4.2.5.2. Peroxidase-anti-Peroxidase Immunhistochemie.....	29
4.2.5.3. Doppelfärbung anti-Kollagen I und II	30
4.3. Statistische Auswertung.....	30
5. Ergebnisse	31
5.1. Wachstum frisch isolierter Chondrozyten in der Monolayerkultur	31
5.1.1. Chondrozytenisolierung und Vitalität	31
5.1.2. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf Zellzahl und Vitalität frisch isolierter Chondrozyten in der Monolayerkultur.....	31
5.1.3. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Proliferation frisch isolierter Chondrozyten	33
5.1.4. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Synthese von spezifischen Proteinen der frisch isolierten Chondrozyten	37
5.1.4.1. Untersuchung der Synthese von Kollagen I und II.....	37
5.1.4.2. Untersuchung der Synthese von Chondroitin-6-phosphat	41
5.1.4.3. Untersuchung der Oberflächenantigene	42

5.2. Wachstum dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur.....	45
5.2.1. Vitalität kryokonservierter dedifferenzierter Chondrozyten	45
5.2.2. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf Zellzahl und Vitalität dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur.....	45
5.2.3. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Proliferation dedifferenzierter Chondrozyten	47
5.2.4. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Synthese von spezifischen Proteinen der dedifferenzierten Chondrozyten	50
5.2.4.1. Untersuchung der Synthese von Kollagen I und Kollagen II.....	51
5.2.4.2. Untersuchung der Synthese von Chondroitin-6-phosphat	53
5.2.4.3. Untersuchung der Oberflächenantigene	55
6. Diskussion	58
6.1. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf das Proliferationsverhalten frisch isolierter und dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur	58
6.2. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Synthese knorpelspezifischer Proteine frisch isolierter und dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur	61
7. Zusammenfassung	65
8. Literaturverzeichnis	67
9. Danksagung	85
Lebenslauf	87

Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DMBA	Dimethylbenzanthrazen
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinacid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELF-EMF	Extremely-low-Frequency Electromagnetic Fields
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EMF	Electromagnetic Fields
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM	Intercellular-Adhesion-Molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEMF	Pulsing Electromagnetic Field
TBS	Tris Base Solution
TGF	Transforming Growth Factor

1. Einleitung

In der rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Hals Bereich besteht ein großer Bedarf an Materialien zur Deckung mehr oder weniger großer Knorpel- und Knochen-defekte. Hierzu kommen in der modernen Medizin unterschiedlichste Verfahren und Materialien zum Einsatz, wobei sich zur Zeit der autologe Gewebettransfer als Verfahren der Wahl etabliert hat. Die Nachteile dieser Methode sind Hebe-defektmorbidität, begrenzte Verfügbarkeit und erhöhter operativer Aufwand. Daneben kommt es zu großen interindividuellen Schwankungen in bezug auf die Transplantatqualität.

Ein Ansatz zur Lösung dieser Probleme stellt das Tissue Engineering dar, das in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Hierzu werden kleine Mengen von Knorpel- oder Knochenzellen entnommen, in der Zellkultur vermehrt und anschließend auf ein Trägermaterial aufgebracht, das dem Patienten dann implantiert werden kann. Diese Methode ist allerdings noch nicht vollständig ausgereift, so kommt es während der Vermehrungsphase der Zellen zu einem Dedifferenzierungsvorgang, bei dem die Zellen ihren knorpel- und knochenspezifischen Phänotyp verlieren und ihre Fähigkeit, Matrixproteine zu synthetisieren, einbüßen. In unterschiedlichen Versuchsmodellen konnten die Zellen stimuliert werden, im dreidimensionalen Trägermaterial wieder Matrixproteine zu synthetisieren.

Es ist bekannt, dass die Behandlung mit elektromagnetischen Feldern in vivo eine Verbesserung der Knochenheilung bewirkt. Auch in vitro konnte für dreidimensionale Zellkulturen zum Teil ein positiver Effekt auf die Synthese von Matrixproteinen nachgewiesen werden.

Es scheint daher sinnvoll, auch den Effekt elektromagnetischer Felder auf Chondrozyten oder Osteoblasten während der Vermehrungsphase in der zweidimensionalen Zellkultur zu untersuchen, um zu überprüfen, ob es bereits in dieser Phase zu einer positiven Beeinflussung der kultivierten Zellen in Hinblick auf Proliferation und Matrixsynthese kommt, die die Redifferenzierung in der 3D- Kultur verbessert.

2. Problemstellung

2.1. Gewebetransplantation im Kopf-Hals-Bereich

Die Therapie bei vollständigem oder teilweisen Verlust oder Funktionsausfall von Geweben und Organen stellt nach wie vor eine besondere medizinische Herausforderung dar.

In unterschiedlichen Fachgebieten, zum Beispiel der Orthopädie und Unfallchirurgie, besteht ein großer Bedarf an Substanzen und Materialien zum Ersatz von Knorpel- und Knochengewebe [19,74,90,133].

Ein weites Indikationsspektrum für den Ersatz bradytropher Gewebe besteht in der rekonstruktiven Chirurgie von Gesicht, Kopf und Hals. Neben Knorpeldefekten an Nase, Ohren, Trachea und Larynx [13,54,76,142,180] gibt es nicht selten knöcherne Substanzdefekte im Bereich des Viszerokraniums, der Mandibula und der Schädelkalotte, die von traumatischen Substanzverlusten, angeborenen und erworbenen Fehlbildungen oder ablativer Tumorchirurgie herrühren können [110,133,154].

Insbesondere in diesem Bereich führen die funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen zu einer schweren Minderung der Lebensqualität betroffener Patienten [60]. Die bis heute entwickelten Methoden zur Deckung der o.g. Substanzdefekte weisen jedoch eine Reihe von schwerwiegenden Nachteilen auf [74,90,111,142].

2.1.1. Autologe Transplantate

Die Verwendung körpereigenen Gewebes zur Defektdeckung wird als autologe Transplantation bezeichnet [133,179]. Diese kann je nach Transplantatgröße und Spenderregion in freier, gestielter und mikrovaskulär reanastomosierter Form erfolgen. Neben den allgemeinen Nachteilen dieser autologen Transplantate wie Hebedefektmorbidität, begrenzter Verfügbarkeit und erhöhtem operativen Aufwand [90,142,163] besteht, besonders bei der Entnahme von Rippen-

knorpel, die Gefahr einer minderen Gewebequalität des Transplantates, z.B. durch Verkalkungs- und sonstige degenerative Prozesse [70]. Ferner ist nicht immer eine exakt defektgerechte Entnahme in Bezug auf Form und Größe möglich [182].

Trotz der genannten Einschränkungen ist die Verwendung autologer Transplantate das zur Zeit am häufigsten verwendete Verfahren mit den am ehesten zufriedenstellenden klinischen Ergebnissen [21] und gilt derzeit als Goldstandard.

2.1.2. Homologe Transplantate

Hierbei handelt es sich um Transplantate von einem anderen Individuum der selben Spezies [179].

Diese Art der Transplantate bergen die Gefahr einer Übertragung von Infektionskrankheiten und der Auslösung einer Antigen-Antikörper vermittelten Abstoßungsreaktion, die durch Konservierung verhindert beziehungsweise abgeschwächt werden soll [77,90].

Ein sicherer Schutz vor Infektionen, z.B. mit dem humanen Immunodefizienz Virus (HIV), wird durch die heute gängigen Methoden der Cialit- und Merthiolatkonservierung jedoch nicht gewährleistet [25,34,46,81,118,176,].

Ferner führen die Konservierungsverfahren häufig zu einem Verlust der Transplantatvitalität, was eine deutlich erhöhte Resorptionsquote im Vergleich zu autologen Transplantaten zur Folge hat [33,80,146].

2.1.3. Heterologe Transplantate

Bei heterologen (xenogenen) Transplantaten werden Gewebe oder Organe einer anderen Spezies verwendet [91,179].

Trotz des nahezu unbegrenzt vorhandenen Spendermaterials konnte sich diese Art der Knorpel- und Knochentransplantation nicht durchsetzen, da eine im Vergleich zu anderen Materialien deutlich erhöhte Resorptions- und Infektionsrate besteht [21,146].

2.1.4. Alloplastische Materialien

Alloplastische Implantate bestehen aus Fremdmaterialien, die zum Verbleib im Körper übertragen werden [179].

Im Kopf- Halsbereich werden zum Knorpel- und Knochenersatz unterschiedlichste Materialien verwendet wie Aluminiumoxidkeramikspangen [29], Trikalziumphosphatkeramiken [79,177], Hydroxylapatit- Granulate, -Blöcke oder -Zemente [75,143], Titan [97], Kohlefaserverbundwerkstoffe [154,181] und andere [63,78,88,132,141].

Die speziellen Nachteile dieser Materialien bestehen in der Auslösung einer Fremdkörperreaktion und dem Auftreten von Korrosionsvorgängen, die die Haltbarkeit des Implantates herabsetzen. Daneben können sie beim Patienten toxische und allergische Reaktionen auf ihre Zerfallsprodukte hervorrufen [141]. Auch die Besiedlung der avitalen Implantate mit Bakterien oder Pilzen ist wesentlich häufiger als bei vitalen Transplantaten und kann zum Verlust des eingebrachten Materials führen [63,88,132].

2.2. Knorpelgewebe

2.2.1. Histologie

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben. Morphologisch ist er durch Knorpelzellen (Chondrozyten) und charakteristische Interzellulärschubstanz (extrazelluläre Matrix) gekennzeichnet [87]. Lichtmikroskopisch lässt sich eine Gliederung in Chondrone (Territorien) erkennen, die jeweils aus einer Gruppe von runden oder ovalen Knorpelzellen mit umgebender stark basophiler Knorpelkapsel (Chondroitinsulfat) bestehen [103]. Die Chondrone sind in die Interzellulärschubstanz (Interterritorien) eingebettet, von der sie sich durch die hell erscheinenden Knorpelhöfe deutlich abgrenzen lassen [96]. Subperichondral ist diese Gliederung aufgehoben. Das Perichondrium besteht aus langgestreckten Fibrozyten und Kollagenfasern und geht allmählich in das eigentliche Knorpelgewebe über, wobei Bindegewebsfasern des Knorpels in das Perichondrium einstrahlen. Reifes Knorpelgewebe ist avaskulär, der gesamte Stoffwechsel erfolgt in dem als bradytroph bezeichneten Knorpelgewebe durch Diffusion über die extrazelluläre Matrix [103]. Die Nährstoffe gelangen über das gefäßreiche Perichondrium zum Knorpelgewebe. Das Perichondrium ist durch Chondrozytenproliferation für die, wenn auch geringe, Regenerationsfähigkeit des Knorpels verantwortlich [140].

2.2.2. Interzellulärschubstanz

Die Interzellulärschubstanz (Knorpelgrundsubstanz, extrazelluläre Matrix) des ausgereiften Knorpelgewebes besteht zum überwiegenden Teil aus Kollagen, Proteoglykanen und Wasser sowie einem geringen Anteil von Mineralien. Das Kollagen macht in etwa 50 % des Trockengewichtes und 90 % des Proteingehalts des Knorpels aus. Es wird aus der von den Chondroblasten synthetisierten Vorstufe Tropokollagen in der Grundsubstanz gebildet und dort eingebettet. Im wesentlichen handelt es sich hier um Fibrillen des knorpelspezifischen Kollagen II. Es besteht aus 3 gleichen α_1 - Typ II Ketten ($[\alpha_1(\text{II})]_3$), die in Form von Tripelhelices mit einer Länge von 300 nm und einer Breite von 1,5 nm vorliegen. Diese zeichnen sich durch ihren hohen Kohlenhydratgehalt (10 %) aus und

aggregieren zu Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 15 bis 25 nm [87,134].

Proteoglykane bestehen aus einem relativ einfachen Proteinskelett, an das kovalent lange lineare Heteroglykanketten geknüpft sind, die zum großen Teil aus sich wiederholenden identischen Disaccharideinheiten bestehen. Diese Disaccharide bestehen aus einem Hexosamin (z.B. Glukosamin) und einem stickstofffreien Monosaccharid (meist Glucuronsäure). Die in Proteoglykanen vorkommenden Heteroglykane werden mit dem Sammelbegriff Glykosaminoglykane bezeichnet. Ihre jeweilige Zusammensetzung bestimmt die Eigenschaft des Proteoglykans. Im Knorpel vorkommende Glykosaminoglykane sind Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Chondroitinsulfat kann bis zu 40 % des Trockengewichtes von Knorpelgewebe ausmachen [109].

2.2.3. Formen des Knorpelgewebes

2.2.3.1. Hyaliner Knorpel

Hyaliner Knorpel findet sich als Gelenkknorpel, Rippenknorpel, im Bereich der Wachstumsfugen und als Knorpel der Atemwege (Nase, Trachea, große Bronchien, Kehlkopf). Er enthält in der Trockensubstanz zu je etwa 40 % Kollagenfasern und das Proteoglykan Chondroitinsulfat sowie etwa 7 % wasserunlösliche Eiweiße. Der hyaline Knorpel zeichnet sich durch Druckelastizität bei einer Druckfestigkeit von ca. 1,5 kg/mm² Querschnitt und eine geringe Zugfestigkeit aus. Hyaliner Knorpel enthält Aggrecan, ein Keratin- und Chondroitinsulfathaltiges Proteoglykan, das eine wichtige Rolle für die Druckfestigkeit des Knorpels und beim Knorpelwachstum spielt [73]. Daneben wurde auch Perlecan, ein heparansulfathaltiges Proteoglycan, isoliert, das mit der Zelladhäsion und der Zell-Matrix-Interaktion in Zusammenhang gebracht wird [165]. Die Eigenschaft der Elastizität ist an das Vorhandensein des Perichondriums gebunden, anderenfalls bricht der Knorpel bei Biegebeanspruchung. Eine Ausnahme stellt hier der Gelenkknorpel dar. Im Alter nehmen Wassergehalt und der Anteil an Chondroitinsulfat ab. Es kommt zum Zelluntergang, zur Demaskierung von Fasern (Asbestfaserung), Höhlenbildung und Kalkeinlagerung [84].

2.2.3.2. Elastischer Knorpel

Der elastische Knorpel unterscheidet sich vom hyalinen durch kleinere, zellärmere Chondrone. Außerdem enthält er elastische Fasernetze, die die Chondrone umgeben, durch die Interzellulärsubstanz ziehen und in das Perichondrium einstrahlen. Er findet sich beim Menschen in der Ohrmuschel, im äußeren Gehörgang, in der Tuba auditiva, der Epiglottis, Teilen des Kehlkopfknorpelskeletts und in den kleinsten Bronchialknorpeln [103].

2.2.3.3. Faserknorpel

Im Faserknorpel sind die Chondrone sehr zellarm, liegen weit auseinander und werden nur von einem dünnen Saum von Knorpelgrundsubstanz umgeben. Den weitaus größten Anteil des Faserknorpels stellen die Kollagenfasern dar, welche hier in unmaskierter Form vorliegen. Faserknorpel bildet die Zwischenwirbelscheiben, die Symphysis pubica sowie, zum Teil, Disci und Menisci der Gelenke und Anteile der Trochlea [103,120].

2.2.4. Knorpelwachstum

Das Wachstum von Knorpelgewebe entsteht im wesentlichen durch eine Volumenzunahme der extrazellulären Matrix. In der embryonalen Entwicklungsphase liegen die einzelnen Vorknorpelzellen zunächst noch in dichten Zellhaufen zusammen. Während der Differenzierung vergrößern sich die Zellen und sezernieren eine metachromatische Grundsubstanz mit den Hauptbestandteilen Chondromukoprotein und Tropokollagen, welches sich in der Interzellulärsubstanz zu einem Netzwerk aus Kollagenfibrillen zusammenlagert [99].

Durch die Volumenzunahme der Interzellulärsubstanz werden die Chondrozyten zunehmend voneinander isoliert und lagern sich schließlich in kleinen Hohlräumen der Matrix an. Dieses sogenannte interstitielle Wachstum ist charakteristisch für die frühe Entwicklungsphase des Knorpelgewebes.

Den Chondrozyten bleibt während des Wachstums zwar eine gewisse Mitosefähigkeit erhalten, entscheidend für das Größenwachstum des Knorpelgewebes ist allerdings die oben beschriebene Volumenzunahme der Interzellulärsubstanz [99] sowie ein appositionelles Wachstum im subperichondralen Bereich durch die Umwandlung von perichondrialen Fibroblasten in Chondrozyten.

Bei Knorpelläsionen nach Abschluss des Wachstums wird der entstandene Defekt durch Proliferation perichondrialer Bindegewebszellen aufgefüllt, welche eine geringe Potenz zur metaplastischen Umwandlung in Chondrozyten besitzen [140].

2.3. Gewebezüchtung

Die modernen Verfahren des Tissue Engineering eröffnen seit einiger Zeit die Möglichkeit, Knorpeltransplantate *in vitro* in unterschiedlichen Formen herzustellen.

Tissue Engineering stellt dabei die Verbindung von Techniken der Ingenieurwissenschaften mit den Methoden der Biowissenschaften dar, um mit Hilfe lebender Zellen und Komponenten der extrazellulären Matrix oder synthetischen Trägermaterialien fehlende Gewebe zu ersetzen, beziehungsweise Gewebefunktionen aufrecht zu erhalten oder, bei eingeschränkter Funktion, sie zu verbessern [160,178].

Fundierte Kenntnisse über das Differenzierungsverhalten von Chondrozyten *in vitro* sowie die Auswahl geeigneter Trägermaterialien sind hierzu von essentieller Bedeutung.

Isolierte Knorpelzellen können mit Hilfe geeigneter Nährmedien und Umgebungsbedingungen für längere Zeit in Kultur gehalten und vermehrt werden. Hierfür stehen eine Vielzahl verschiedener Techniken zur Verfügung, wobei die Zellzüchtung in der zweidimensionalen Monolayerkultur für adhärente Zellen die gebräuchlichste ist [58]. Im Vergleich zu den Wachstumsverhältnissen *in vivo* fehlen jedoch bei *in vitro* gezüchteten Zellen die Einflüsse aus dem Wechsel-

spiel mit dem interzellulären Gewebe sowie eine Anzahl von z.T. unbekanntem Wachstumsfaktoren. Für humane Chondrozyten aus Nasenseptumknorpel konnte eine Steigerung der Proliferationsrate durch Zugabe von b-FGF, TGF-beta und in geringem Maße EGF als Kulturmedienzusatz gezeigt werden. Die größte Stimulation auf die Chondrozytenproliferation ergab sich bei einer Kombination dieser drei Wachstumsfaktoren mit fetalem Kälberserum, wobei allerdings die alleinige Zugabe von fetalem Kälberserum nahezu den gleichen stimulierenden Effekt aufwies [23,29,139].

Das Zellwachstum in Monolayerkulturen folgt einem typischen "lag-log-lag" Muster: In den ersten 24 Stunden nach Isolation oder Subkultivierung findet sich nur wenig mitotische Aktivität. Dann folgt eine Phase logarithmischer Zellvermehrung, bis sich mit dem Erreichen der Konfluenz im Monolayer eine Plateauphase einstellt. Nach einer endlichen Anzahl von Subkultivierungsschritten bzw. Zellverdoppelungen erreicht die Zellkultur eine Phase, in der die mitotische Aktivität nachlässt und sich die Gesamtzellzahl mehr und mehr verringert, bis die Zellen schließlich absterben [58]. Für Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation ab der achten bis zehnten Subkultivierung sistiert [48,115]. Es besteht ein breiter Konsens über die Tatsache, dass Chondrozyten in Monolayerkultur ihren knorpelspezifischen Phänotyp verlieren [11,12,45,48,168,169]. Dieser Prozess wird allgemein als Dedifferenzierung bezeichnet [10]. Er zeigt sich in einer Änderung der Zellmorphologie von runden zu spindelförmigen fibroblastenähnlichen Zellformen. Daneben tritt ein Switch der Kollagensynthese von Typ II zu Typ I und Typ III auf. Außerdem wird die Produktion von Fibronectin beobachtet. Ein Redifferenzierungsverhalten wurde erstmals bei Kaninchenchondrozyten beschrieben, die zuvor eine Dedifferenzierungsphase durchlaufen hatten [12]. Die Chondrozyten waren nach ein bis zwei Wochen innerhalb eines Agarosegels wieder in der Lage, das knorpelspezifische Kollagen Typ II zu synthetisieren. Zur gleichen Zeit ließ sich ein Wiederauftreten der typischen runden Zellformen beobachten.

Dieselben Phänomene wurden inzwischen auch bei humanen Chondrozyten nachgewiesen [7]. Dies ist, da für Chondrozyten erhebliche speziesspezifische Unterschiede des Differenzierungsverhaltens gezeigt wurden [1,36,94,95], von

entscheidender Bedeutung für die Herstellung von humanem Knorpelgewebe *in vitro*. Schließlich sind nur differenzierte Chondrozyten in der Lage, die typischen Matrixbestandteile von Knorpel zu synthetisieren, die seine einzigartigen mechanischen Qualitäten bedingen.

Unerlässlich sind daher geeignete Kulturverfahren, die eine Stabilität oder Redifferenzierung des Chondrozytenphänotyps ermöglichen. In Frage kommen dreidimensionale Kultursysteme wie Suspensionskulturen [9], Kollagengele [114] oder Agarosegele [8,12,31,121,122]. Gemeinsam ist diesen Kultursystemen jedoch eine sehr aufwendige Handhabung.

Daher ist es erforderlich neue Kultivierungsverfahren zu untersuchen, die bereits während der Amplifizierungsphase in der Monolayerkultur das Differenzierungs- beziehungsweise Dedifferenzierungsverhalten beeinflussen. Eine Möglichkeit könnte hier die Kultivierung der Chondrozyten unter Einfluss elektromagnetischer Felder sein.

2.4. Auswirkungen elektromagnetischer Strahlung

Die Auswirkungen elektromagnetischer Strahlung auf Zellsysteme werden kontrovers diskutiert. Das öffentliche Interesse an einem möglichen Gesundheitsrisiko durch den sogenannten „Elektrosmog“ wird immer größer: Einige Wissenschaftler konnten einen Zusammenhang zwischen elektromagnetischen Feldern und einer erhöhten Krebsrate bei Kindern herstellen [171,172,173]. Gleichzeitig wird im medizinischen Bereich bei den verschiedensten Indikationen die „Magnetfeldtherapie“ eingesetzt [20,82,106,125]. Diese unterschiedlichen Effekte werden trotz einer Vielzahl epidemiologischer und experimenteller Experimente sehr kontrovers diskutiert. Von besonderem Interesse sind die technisch erzeugten extrem niederfrequenten Felder (ELF-EMF) und die Radiofrequenzen.

2.4.1. Formen elektromagnetischer Strahlung

Es werden drei Arten der elektromagnetischen Strahlung unterschieden. Zum einen das statische magnetische Feld, das ubiquitär vorkommt und durch den Geomagnetismus der Erde bedingt ist. Im Labor lässt es sich durch Elektro- oder Permanentmagneten erzeugen. Große magnetische Felder (>1 T) können Systeme über ein freies Radikal beeinflussen. Auf diesem Effekt basiert die Technik der Magnet Resonanz Tomographie [156].

Zum anderen gibt es gepulste Felder (PEMF) unterschiedlicher Frequenzen, die technisch in Sägezahn- oder Sinusform erzeugt werden.

Auch bei ionisierender Strahlung und nichtionisierenden PEMF handelt es sich um elektromagnetische Wellen bzw. Felder, die eine elektrische und magnetische Komponente aufweisen. Sie sind charakterisiert durch ihre Wellenlänge, Frequenz und die beinhaltete Energie, welche sich gegenseitig bedingen. Elektromagnetische Felder können im sogenannten elektromagnetischen Spektrum eingereiht werden. Die elektromagnetischen Felder, die durch industrielle Stromproduktion (Europa 50 Hz; USA 60 Hz) entstehen, sind demnach extrem niederfrequent. Charakteristisch ist eine Frequenz von 0-300 kHz, eine magne-

tische Flussdichte (B) von 0,1-30 mT und eine elektrische Feldstärke (E) von 0,01-100 mV/cm². In der normalen häuslichen Umgebung wird eine durchschnittliche Belastung von 0,2 µT/24 h erreicht, die kurzzeitig höher liegen kann (Elektrorasierer, Fön, Handy) [61,166]. Radiofrequenzen und Mikrowellen liegen in einem deutlich höheren Frequenzbereich von 300 kHz-300 GHz. Sie haben kürzere Wellenlängen und eine höhere Energieleistung, die Wärme in leitenden Materialien erzeugen kann. Diese thermischen Eigenschaften sind heute gut untersucht und analysiert, die nichtthermischen Effekte dürfen hier jedoch nicht außer Acht gelassen werden [167]. Eine noch höhere Frequenz findet sich bei den Röntgenstrahlen ($>10^{18}$ Hz). Ihre Energien können Ionisierungen verursachen, die molekular Bindungen lösen und somit zu direkten DNA Schädigungen führen können [65]. ELF-EMF besitzen dagegen nur geringe Energien, die keine chemischen Bindungen lösen können. Es scheint daher extrem unwahrscheinlich, dass diese Strahlung direkt kanzerogen oder mutagen wirken kann [2,62,166].

2.4.2. Epidemiologische Studien

In der Literatur finden sich einige Studien, die eine Wechselwirkung zwischen der Exposition ELF-EMF und Krebs im Kindesalter (<15 Jahre), insbesondere Leukämie postulieren. Bei diesen Untersuchungen wurde das Hauptaugenmerk auf die magnetische Feldkomponente gelegt. Es wurden Populationen im näheren Umkreis von Überlandleitungen untersucht [3,55,69,131,155,173]. Da es sich hierbei um retrospektive Studien handelt, beinhalten sie unterschiedliche Expositionseinheiten, was die statistische Analyse erschwert und z.T. verfälscht. Andere Studien belegen ein erhöhtes Krebsrisiko für Erwachsene, die berufsbedingt höheren elektromagnetischen Feldern ausgesetzt sind: Schweißer, Galvaniseure, Lokomotivführer, Arbeiter in der Metall- und Elektroindustrie und andere [3,56]. Doch auch hier ist eine exakte Dosimetrie schwierig.

2.4.3. Tierexperimentelle Studien

Im Zentrum des Interesses steht bei den tierexperimentellen Studien eine Tumor-(Co)-Promotion von ELF-EMF. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Induktion von Mamakarzinomen in weiblichen Ratten durch Dimethylbenzanthrazen (DMBA) zu einer um 50 % erhöhten Tumorrates führten, wenn die Tiere einem Magnetfeld von 50 Hz und 100 μ T exponiert waren [112,119]. Die erhöhte Tumorrates scheint mit einer Reduktion der Melatoninausschüttung aus der Zirbeldrüse in Zusammenhang zu stehen, die durch ELF-EMF hervorgerufen wird [105,144]. Hieraus könnte gefolgert werden, dass körpereigene Abwehrmechanismen gegen Tumorzellen durch ELF-EMF beeinträchtigt werden.

2.4.4. Elektromagnetische Felder und Knochenheilung

Das Haupteinsatzgebiet von ELF-EMF in der sogenannten Magnetfeldtherapie bildet die Knochenheilung. Nachdem in zahlreichen Tiermodellen nachgewiesen werden konnte, dass die Bildung von Knochenmatrix durch piezoelektrische Impulse gesteuert wird und somit die Applikation von elektrischen Strömen die Knochenbruchheilung und Knochenneubildung positiv beeinflussen kann [40,57,83], werden seit den 1970er Jahren Magnetfelder auch klinisch angewandt. Indikationsgebiete sind die Frakturbehandlung, Behandlung von Pseudoarthrosen und Einheilung von Totalprothesen [92,93,152,102,103,104]. Es werden hierbei Magnetfelder mit einem kontinuierlichen sinusförmigen Verlauf in einem Frequenzbereich zwischen 0,2 und 20 Hz und einer magnetischen Flussdichte von 2-10 mT verwendet.

2.4.5. Einwirkungen von extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldern auf Zellsysteme

Der Energiegehalt von ELF-EMF ist zu klein, um physiko-chemische und biologische Wirkungen durch Ionisation oder thermische Effekte hervorzurufen.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass bei Immunzellen ein enger Zusammenhang zwischen der Wirkung der applizierten ELF-EMF und dem Grad der Zellaktivierung besteht [35,170]. Daraus wurde geschlossen, dass externe ELF-EMF durch Einkoppelung in intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden mit dem Zellsystem interagieren [2,67]. Als Angriffspunkt werden hier Resonanzphänomene einzelner Ionenarten (z.B. Calciumionen), ionenbindender Proteine (z.B. Calciumionen bindendes Calmodulin) oder Zellmembranbestandteile (z.B. Rezeptoren, Ligand-Rezeptorkomplexe) vermutet [51,52]. Daneben existiert die Theorie des sogenannten Radikal-Paar-Mechanismus, bei dem durch Beeinflussung von spinabhängigen Radikalpaaren unterschiedliche Zellantworten ausgelöst werden sollen [164,174]. Ferner wurden ELF-EMF Effekte auf unterschiedliche Enzymreaktionen beschrieben [71,86,129]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht restlos aufgeklärt.

3. Ziel der Arbeit

Für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe zum Einsatz in der rekonstruktiven Chirurgie werden Knorpelbiopsien benötigt, aus denen vitale Chondrozyten enzymatisch isoliert werden. Die Knorpelzüchtung erfolgt dann in 2 Schritten: Zunächst werden die Zellen in der zweidimensionalen Monolayerkultur amplifiziert. Im zweiten Schritt werden von den amplifizierten Zellen in einem dreidimensionalen Kulturmodell die knorpelspezifischen Matrixproteine synthetisiert.

Aus den Biopsaten können meist nur sehr kleine Ausgangszellzahlen gewonnen werden. Die isolierten Chondrozyten sind aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades nicht in der Lage, mitotische Zellteilungen durchzuführen. Wie oben beschrieben, kommt es in der Monolayerkultur zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten, wodurch die Zellen ihre Proliferationsfähigkeit wieder erlangen. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl, die eine Besiedelung der dreidimensionalen Trägerstrukturen mit einer gewebetypischen Zelldichte ermöglicht, haben die Zellen ihren chondrozytenspezifischen Phänotyp verloren.

Positive Effekte von elektromagnetischen Feldern auf das Differenzierungsverhalten von Knorpelzellen in vivo und in dreidimensionalen Kulturmodellen wurden in der Literatur beschrieben.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Befeldung der Knorpelzellen mit elektromagnetischen Feldern während der Amplifizierungsphase die Dedifferenzierung der Knorpelzellen verringert bzw. verhindert oder eine Redifferenzierung bereits entdifferenzierter Zellen schon in der Monolayerkultur einleitet. Es wurden daher das Proliferationsverhalten frisch isolierter und langzeitkultivierter dedifferenzierter Chondrozyten unter ELF-EMF-Einfluss mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Ferner wurden die Syntheseleistungen knorpelspezifischer Proteine und Oberflächenantigene bestimmt.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

Liste der verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge:

Aceton (Merck, Darmstadt, FRG)

L-Ascorbin Säure Natrium Salz (Sigma, München, FRG)

Aqua at injectabilis (Braun Melsungen, Melsungen, FRG)

Barrycidal 36 Desinfektionsmittel (Interchem AG, Zug, CH)

DMSO (Merck, Darmstadt, FRG)

DNase II (Paesel, Frankfurt, FRG)

Essigsäure (Merck, Darmstadt, FRG)

Ethanol (Apotheke Klinikum Großhadern, München, FRG)

L-Glutamin 200mM (Biochrom, Berlin, FRG)

Gentamicin (Refobacin 80, Merck, Darmstadt, FRG)

Hank'sche Lösung ohne Calcium, ohne Magnesium (Apotheke Klinikum Großhadern, München, FRG)

Hyaluronidase Typ I-S (Sigma, München, FRG)

Kollagenase II Typ CLS II (Seromed, Berlin, FRG)

Notoxhisto (Earth safe, Belle Mead NJ, USA)

PBS (Apotheke Klinikum Großhadern, München, FRG)

Schweineserum (DAKO, Hamburg, FRG)

Tris-Puffer (Merck, Darmstadt, FRG)

Trypanblau (Fluka, Neu-Ulm, FRG)

Trypsin/EDTA (Seromed, Berlin, FRG)

Ziegenserum (DAKO, Hamburg, FRG)

4.1.2. Histologie

4.1.2.1. Immunhistochemie

Liste der verwendeten Antikörper:

- Antikörper für Alkalische Phosphatase-Antiperoxidase-Färbung:

Collagen II monoclonal mouse (Yoo, Memphis TE, USA)

ICAM-I mouse (Coulter-Immunotech, Krefeld, FRG)

HLA-I mouse (DAKO, Hamburg, FRG)

HLA-II mouse (Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Maus-Immunglobulin (DAKO, Hamburg, FRG)

APAAP Immunkomplex Maus (DAKO, Hamburg, FRG)

- Antikörper für Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung:

Collagen I rabbit (Monosan, Uden, NL)

Collagen II polyclonal rabbit (Quartett, Berlin, FRG)

Chondroitinsulfat polyclonal rabbit (Chemikon, Tenecula CA, USA)

Ki-67 monoclonal mouse (Chemikon, Tenecula CA, USA)

Rabbit-Immunglobulin (Dako, Hamburg, FRG)

PAP Immunkomplex rabbit (Dako, Hamburg, FRG)

Collagen II polyclonal goat (Monosan, Uden, NL)

2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck, Darmstadt, FRG)

Levamisol (Sigma, München, FRG)

N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, FRG)

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

Natriumnitrit (Merck, Darmstadt, FRG)

Neufuchsinlösung (Chroma-Gesellschaft, Köngen/N., FRG)

4.1.3. Medium und Zusätze

- Dulbecco's MEM (1x):
 - ohne Glutamin
 - ohne Na-Pyruvat
 - mit 4,5 g/l Dextrose
 - mit 3,7 g/l NaCO³ (Seromed, Berlin, FRG)
- Ascorbat 50 mg (Sigma, München, FRG)
- Fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert (Gibco-BRL, Deisenhofen, FRG)
- L-Glutamin 200mM (Biochrom, Berlin, FRG)
- Refobacin 80 mg (Gentamicin, Merck, Darmstadt, FRG)

4.1.4. Testsysteme für Zellproliferation und Kollagensynthese

4.1.4.1. Zell-Proliferations-ELISA, BrdU (colorimetric)

BrdU labeling reagent: 10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridine in PBS, pH 7,4, 1000x (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

FixDenat: ready-to-use (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

Anti-BrdU-POD: monoclonal mouse hybrid cells (clone BMG 6H8, Fab fragments) conjugated with Peroxidase (POD) (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

Antibody dilution solution: PBS mit 0,1% BSA (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

Washig buffer: PBS, 10x (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

Subtrat: ABTS (2,2-Azino-di3-ethylbenzthiatoline sulfonate(6)diammonium salz) (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

ABTS-Puffer: besteht aus Natriumperborat, Citronensäure und Dinatriumhydrogenphosphat (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)

4.1.4.2. Sirius Red Collagen ELISA

Dye reagent: Sirius Red in picric acid (Biocolor, Belfast, UK)

Alkali reagent: 0,5 M NaOH (Biocolor, Belfast, UK)

Collagen standard: acid soluble Type I Collagen in 0,5 M acetic acid [1mg/ml]
(Biocolor, Belfast, UK)

4.1.5. Geräte

Autoklaviereinrichtung (Webeco, FRG)

Brutschrank (Heraeus, Osterode, FRG)

Laborzentrifuge (Haereus Christ, Osterode, FRG)

Laminar Flow (Ceag Schirp „Envirca“, Bork/Westfalen, FRG)

Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen, FRG)

Magnetfeldgenerator (Hirschmann, Unterhaching, FRG)

Magnetspulen (Magnetodyn, München, FRG)

Magnetrührer Ikamag EOA-3 (Jahnke & Kunkel, Staufen i. Br., FRG)

Photometer Titertek Multiscan (Eflab, FI)

Wasserbad (Haake E-8, Karlsruhe, FRG)

Kühlung für Magnetspulen (Haake F3, Karlsruhe, FRG)

Schüttler IKA MTS 4 (Jahnke & Kunkel, Staufen i. Br., FRG)

4.1.6. Kulturschalen und Filter

Konzentratoren Centriplus-100 (Amicon, Witten, FRG)

Kulturflaschen T-25 (Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Kulturflaschen T-75 (Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Kulturflaschen T-125 (Greiner, Frickenhausen, FRG)

Petrischalen (Greiner, Frickenhausen, FRG)

Probengefäße 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht, FRG)

Probengefäße 50 ml (Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Sieb 50 µm (Chondrozytenisolierung) (Reichelt Chemitechnik, Heidelberg, FRG)

Sterilfilter 22 µm/45 µm(für Enzymlösung) (Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)

Sterilfilter 0,2 μm (für Ascorbat – Lösung) (Gelman Science, Ann Arbor MI, USA)

96-Well-Kulturschalen (Nunc, Wiesbaden, FRG)

Lab-Tek Chamber-Slide 8 Well (Nunc, Wiesbaden, FRG)

4.2. Methoden

4.2.1. Magnetbefeldung

Zur Erzeugung des elektromagnetischen Feldes, in dem die Kultivierung der Chondrozyten erfolgte, wurden von der Firma Magnetodyn[®], München konstruierte und zur Verfügung gestellte zylindrischen Magnetspulen (Solenoid) verwendet.

Die Befeldungseinrichtung wurde wie folgt installiert: Es wurden 2 Solenoide in einem Brutschrank untergebracht und über ein Wasserkühlsystem mittels Thermostat auf 37°C eingeregelt. Die beiden Spulen wurden an einen Funktionsgenerator der Firma Magnetodyn[®] ($U_{\text{eff}} = 36,5 \text{ V}$; $R = 20 \Omega$; $I = 10$) angeschlossen, der ein Sinussignal mit einer Frequenz von 20 Hz sendet. Bei einer Intensitätseinstellung von 10 ergaben sich daraus Feldstärken zwischen 6,0 und 7,5 mT im Inneren der Solenoide. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen den schematischen Aufbau und eine Übersichtsfotografie der Befeldungseinrichtung mit Magnetspule, Brutschrank, Kühlsystem und Feldgenerator.

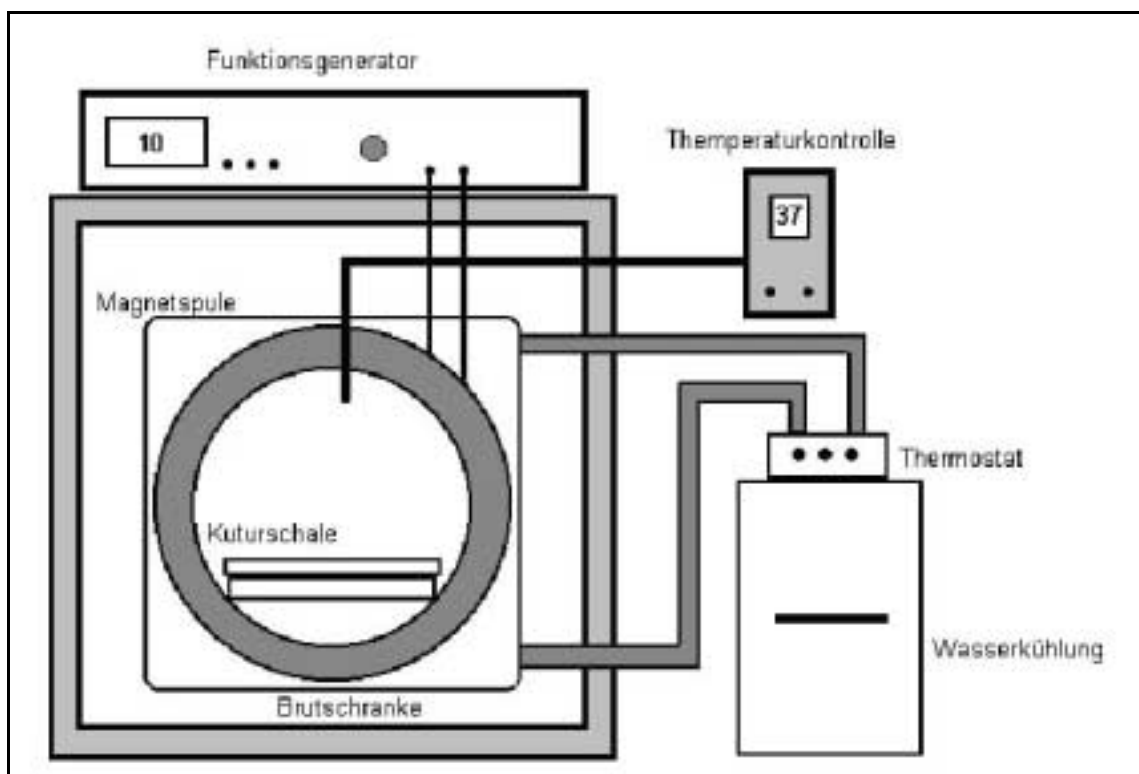


Abb. 1 Schematischer Aufbau der Befeldungsanlage im Brutschrank mit Magnetspule, Funktionsgenerator und Wasserkühlung



Abb. 2: Magnetspulen im Brutschrank

4.2.2. Zellkulturtechniken

4.2.2.1. Gewinnung des Knorpelgewebes

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Chondrozyten handelte es sich um Zellen, die aus vitalem humanen Nasenseptumknorpel isoliert wurden. Das Knorpelgewebe wurde während rekonstruktiver Eingriffe an der Nase von Patienten im Alter zwischen 19 und 66 Jahren gewonnen.

Um intraindividuelle Unterschiede im Wachstumsverhalten der Chondrozyten zu vermindern, wurde für jeden Versuchsansatz das Knorpelgewebe von mindestens drei Patienten gepoolt. Bis zur Zellisolierung wurden die Knorpelproben in Dulbecco's MEM mit 10 % FCS und 20 mg/l Gentamicin im Brutschrank (+37 °C, 5 % CO₂ und H₂O-Dampfsättigung) aufbewahrt. Bei regelmäßigem Wechsel des Nährmediums bleibt so eine Vitalität der Chondrozyten von mehr als 80% über einen längeren Zeitraum erhalten [26].

4.2.2.2. Chondrozytenisolierung

Nach mechanischer Reinigung der Knorpelproben von Blut, Bindegewebs- und Knochenresten mittels Spülung mit D'MEM und unter Zuhilfenahme von Skalpell und Pinzette, wurden die Stücke fein zerkleinert und in einen 20 ml Erlenmayer-Kolben mit Magnetrührer eingebracht. Nach Zugabe einer Enzymlösung aus D'MEM mit 0,15 mg/ml DNase II, 0,1 mg/ml Hyaluronidase und 2 mg/ml Kollagenase II, wurden die Knorpelstückchen für 12 bis 16 Stunden im Brutschrank inkubiert (Magnetrühreinstellung: 1 U/sec).

Die so entstandene Zellsuspension wurde durch ein steriles Nyloonsieb (Porengröße: 50 μm) in 50 ml Probengefäß pipettiert. Erlenmayer-Kolben und Sieb wurden mit D'MEM mit 10 % FCS nachgespült. Anschließend wurde bei 1200 U/min 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit einem kleinen Volumen D'MEM mit 10 % FCS resuspendiert und Anzahl und Vitalität der Zellen bestimmt.

4.2.2.3. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurde ein kleiner Teil der Zellsuspension mit einer 0,05 % Trypanblaulösung 2:1 vermischt. 10 μl dieser Lösung wurden in eine Neubauerkammer gefüllt. Aufgrund der veränderten Permeabilität der Zellmembran avitaler und geschädigter Zellen kann das Trypanblau einströmen und färbt Zytoplasma und Zellkern blau. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun die Chondrozyten ausgezählt und die Vitalität als prozentualer Anteil der nicht angefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben.

4.2.2.4. Ansatz der Monolayerkultur

Anschließend wurden die Chondrozyten in einer Dichte von ca. 20 000 Zellen/ cm^2 in Kulturflaschen unterschiedlicher Größe (25 cm^2 , 75 cm^2 und 125 cm^2) eingebracht und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. In Abhängigkeit von der Flaschengröße wurden die Zellen in 8 ml, 20 ml oder 40 ml

Nährmedium suspendiert. Als Nährmedium wurden 500 ml Dulbecco's MEM mit 5 ml L-Glutamin 200 mM und 80 mg Gentamicin versetzt. Diesem wurden unmittelbar vor Gebrauch 10 % FCS und Ascorbat in einer Konzentration von 0,1 mg/ml hinzugefügt. Das Kulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt, wobei frisches Medium mit gebrauchtem und bei 2000 U/min zentrifugiertem Medium 1:2 gemischt wurde. Das restliche gebrauchte Medium wurde zur späteren Bestimmung des Kollagengehaltes eingefroren. Um die Zellzahlen vergleichen zu können wurden die frisch isolierten Chondrozyten mit hoher Proliferationstendenz alle 5 Tage, die dedifferenzierten Chondrozyten alle 7 Tage subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült, dann für 3 Minuten mit einer 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, was eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden bewirkt. Daraufhin wurden die abgelösten Chondrozyten dreimal mit D'MEM mit 10 % FCS gewaschen, zentrifugiert und nach Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erneut ausgesät.

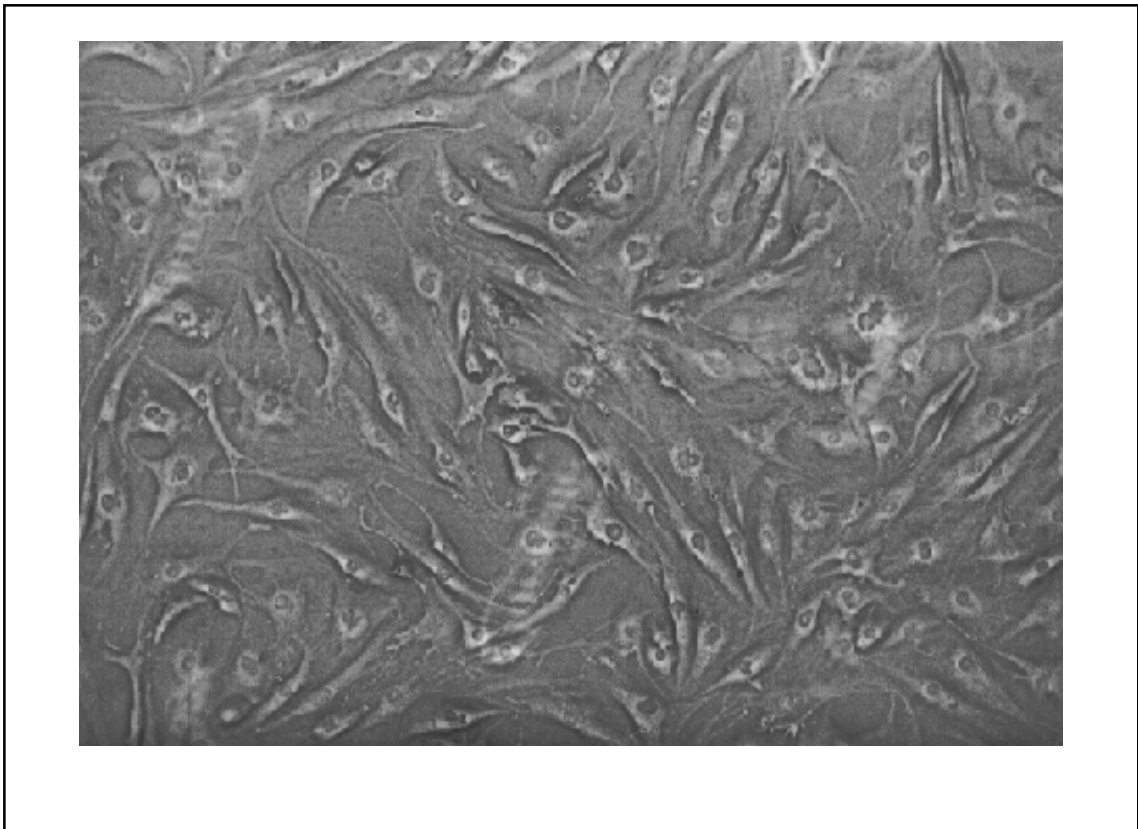


Abb. 3: Adhärenente Chondrozyten in der Monolayerkultur am 4. Kultivierungstag

4.2.2.5. Kryokonservierung humaner Chondrozyten

Chondrozyten, die nach der Isolation nicht benötigt wurden, wurden eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Proliferations- und Redifferenzierungsfähigkeit blieben hierbei erhalten [116]. Zum Einfrieren wurden Zellsuspension, FCS und DMSO im Verhältnis 2:1:1 in einem 1,8 ml Eppendorf Cryo-Röhrchen miteinander vermischt. Um die Zellen zu schonen wurden sie zunächst ein bis zwei Tage bei -80 °C eingefroren, bevor sie in den flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Pröbchen im 37 °C warmen Wasserbad angetaut und dann in ca. 40 ml Nährmedium suspendiert. Um die Chondrozyten von DMSO zu reinigen wurde zentrifugiert und resuspendiert. Anschließend erfolgten Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.

4.2.3. Messung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA und BrdU-Färbung

Zur quantitativen Messung der Zellproliferation wurde ein BrdU-ELISA verwendet. Zellen, die sich in Proliferation befinden, bauen in Gegenwart des Thymidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin dieses in der S-Phase des Zellzyklus in ihre DNA ein, ähnlich dem Einbau von $[^3\text{H}]$ -Thymidin, der Standardmesstechnik von Zellproliferation. Allerdings wird bei der des BrdU-ELISA der Gebrauch von Isotopen vermieden. Das eingebaute BrdU kann mit einem monoklonalen anti-BrdU-Antikörper aus Maus-Maus-Hybridzellen erkannt werden. Eine an den Antikörper gekoppelte Peroxidase führt zur Umsetzung des Substrats ABTS® (2,2-Azino-di(3-ethylbenzthiatoline sulfonate(6)diammoniumsalz) zu einem grünen Farbstoff, dessen Extinktion bei 405 nm gegen 490 nm gegen Leerwert gemessen werden kann. Da die Extinktion proportional zu Substratumsatz ist und dieser wiederum von der Anzahl der BrdU-anti-BrdU-Ak-Bindung abhängt, ist die Extinktion ein Maß für die Zellproliferation [137,138].

Um diesen Versuch durchzuführen wurden Chondrozyten auf einer 96-Loch-Multiwellplatte in einer Dichte von 2500 Zellen pro Well in 100 µl D'MEM mit 10 % FCS pro Well ausgesät und über 7 Tage im Brutschrank kultiviert. Am dritten Tag nach der Aussaat wurde das Medium durch 100 µl Hungermedium (D'MEM ohne FCS) pro Well ersetzt, damit alle Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus kommen. Am fünften Tag wurde das Hungermedium wieder gegen D'MEM mit 10 % FCS ausgetauscht, um die Proliferation zu stimulieren. Am sechsten Tag wurden sämtliche Wells mit Ausnahme der Leerwert-Wells mit 10 µl einer 100 µM BrdU-Lösung versetzt. Nach 18stündigem BrdU-Labeling wurden am siebten Tag der Mediumüberstand abpipettiert und die Zellen mit 200 µl Fix Denat pro Well 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde nach erneutem Abpipettieren des Überstandes die Anti-BrdU-POD-Lösung (0,15 U/ml; 100 µl/Well) zugegeben und 90 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl PBS pro Well wurde ABTS[®] als Substrat zugegeben und die Extinktion nach 15 Minuten mit dem Photometer bei 405 nm gegen 490 nm gegen Leerwert gemessen.

Für die BrdU- Färbung wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren, die Chondrozyten wurden allerdings nicht auf Multiwellplatten, sondern auf 8- Well Chamber- Slides ausgesät. Mediumwechsel und BrdU-Labeling wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Statt ABTS wurde als Substrat Neufuchsin zugegeben, mit dem in einer flachen Färbeküvette 20 Minuten gefärbt wurde. Die Gegenfärbung erfolgte durch kurzes Färben mit Hämalaun.

4.2.4. Quantitative Bestimmung des löslichen Kollagens im Kulturüberstand mittels Kollagen-Assay

Zur Bestimmung der Menge des löslichen Kollagens im Kulturüberstand wurde ein Kollagen-Assay der Firma BIOCOLOR[®] verwendet. Der Test basiert auf der Reaktion des Farbstoffes Sirius Rot mit den Kollagen Seitenketten. Der anionische Farbstoff hat NaSO₃-Seitengruppen, die mit den basischen Seitengruppen der im Kollagen vorhandenen Aminosäuren eine Bindung eingehen. Hierbei lagert sich das langkettige Farbmolekül parallel an das Kollagen an. Durch

Zentrifugation und Dekantieren erhält man eine der Kollagenmenge proportionale Farbmenge, die sich nach Resuspendieren mit einem Lösungsmittel fotometrisch bestimmen lässt [145,175].

Das gebrauchte Medium der Monolayer Kulturen wurde über zwei Wochen gesammelt und eingefroren. Da der Kollagengehalt unter der Nachweisgrenze des Tests lag, musste es zunächst konzentriert werden. Hierzu wurde ein Centriplus 100® Konzentrator verwendet. Dieser besteht aus einem Probenbehälter, dessen Boden von einer anisotropen Filtermembran gebildet wird, einem Filtratgefäß und einem Retentatgefäß. Nach genauer Messung des Gesamtvolumens der gesammelten Mediumprobe wurden 10 ml Medium in den Probenbehälter pipettiert, dieser wurde auf das Filtratgefäß aufgesteckt und die zusammengesteckte Einheit dann bei 3000 g zentrifugiert bis sämtliche Flüssigkeit und die darin enthaltenen Moleküle bis 100 kD (Albumin aus dem FCS) durch den Filter in das Filtratgefäß gelangt waren. Zur Rückgewinnung des im Probenbehälter verbliebenen Kollagens (MG > 100 kD) wurden dann 2 ml PBS hinzugefügt, der Probenbehälter umgedreht, in das Retentatgefäß eingesetzt und zum Transfer der konzentrierten Probe in den Retentatbehälter für zwei bis drei Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Mit derartig vorbereiteten Proben konnte nun der Kollagen-Assay durchgeführt werden.

Der Kollagen-Assay wurde in 1,5 ml Eppendorf-Cups angesetzt. Er enthielt den Leerwert in Form von 100 µl PBS, Standards von 12,5 µl, 25 µl und 50 µl einer Kollagen-Lösung der Konzentration 1 mg/ml, die mit PBS auf 100 µl aufgefüllt wurden und jeweils 100 µl der konzentrierten Mediumproben. Um eine höhere Genauigkeit zu erzielen wurden von jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt. Zu den jeweils 100 µl Flüssigkeit in den Eppendorf-Cups wurden 1000 µl des Sirius Rot Farbreagenz hinzu pipettiert und auf einem Rüttler 30 Minuten gemischt. Danach wurden die Proben bei 5000 g 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet in 0,5 M NaOH resuspendiert. Zur fotometrischen Bestimmung wurden jeweils 200 µl aus den einzelnen Eppendorf-Cups in eine Multiwellplatte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen den Leerwert fotometriert. Anhand der Standards

und unter Berücksichtigung des Konzentrationsfaktors konnte so die Kollagenkonzentration im Kulturmedium bestimmt werden.

4.2.5. Histochemie

4.2.5.1. Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen I, ICAM I und HLA II erfolgte mit der APAAP-Methode.

Luftgetrocknete Monolayer-Kulturen humaner Chondrozyten wurden hierzu 90 s mit Methanol / Aceton 1 : 1 fixiert und anschließend 2 x 5 Minuten mit TBS gespült. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde das Präparat für 20 Minuten in einer feuchten Kammer mit Schweineserum/ PBS (1 : 5) inkubiert. Nach Abklopfen dieser Lösung wurde der jeweilige Primärantikörper aufgetragen. Die Konzentration des Antikörpers und die Dauer der Inkubation lassen sich der folgenden Tabelle entnehmen:

Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
Ki-67	1 : 50 und 1 : 25	1 h
Rabbit-Anti-Human Kollagen II	1 : 20	18 h
Maus-Anti-Human Kollagen II	1 : 100	1 h
Maus-Anti-Human ICAM I	1 : 3000	1 h
Maus-Anti-Human HLA II	1 : 10	1 h

Nach Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde das Präparat 2 x 5 Minuten mit TBS gespült und dann der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1 : 50 für 30 Minuten aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem APAAP-Enzymkomplex (1 : 100 in 5 % Schweineserum für 30 Minuten). Die Präparate wurden nochmals mit TBS gewaschen und die

Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Enzymkomplex für jeweils 15 Minuten wiederholt.

Die Sichtbarmachung der Antikörperkomplexe erfolgte unter Verwendung der Neufuchsin Methode [39]. Hierzu wurden 25 ml 0,2 M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol mit 75 ml Tris- Puffer, 675 mg NaCl und 40 mg Levamisole gemischt. Dieser Mischung wurden 30 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat gelöst in 600 µl DMF zugegeben. Zuletzt wurden 20 mg Natriumnitrit in 500 µl Aqua dest. mit 200 µl 5%iger Neufuchsinlösung zugegeben und die Präparate in einer Färbeküvette für 20 Minuten gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte durch 30 s Färben mit Hämalaun.

4.2.5.2. Peroxidase-anti-Peroxidase Immunhistochemie

Zum Nachweis von Kollagen I und Chondroitinsulfat wurde die Peroxidase-anti-Peroxidase kurz PAP-Methode verwendet.

Wie bei der APAAP-Methode wurde das Präparat zunächst in Methanol/Aceton fixiert und die unspezifischen Bindungen mit Schweineserum (1 : 4 in TBS) blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 30 Minuten in der feuchten Kammer, wobei der anti-Kollagen I Antikörper in einer Konzentration von 1 : 30 in 5 % Schweineserum und der Anti-Chondroitinsulfat-Antikörper in einer Konzentration von 1 : 300 in 5 % Schweineserum verwendet wurden. Als sekundärer Antikörper wurde ebenfalls für 30 Minuten mit Kaninchenimmunglobulin (1 : 50 in 5 % Schweineserum) inkubiert. Anschließend wurde der PAP-Enzymkomplex für 30 Minuten aufgetragen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und dem PAP-Enzymkomplex wurde danach für jeweils 10 Minuten wiederholt. Zwischen allen Schritten wurden die Präparate gründlich mit TBS gespült. Färbung: Neufuchsin, Gegenfärbung mit Hämalaun, Einbettung der Präparate in Gelatine.

4.2.5.3. Doppelfärbung anti-Kollagen I und II

Zu Darstellung von Kollagen I und Kollagen II in dem selben Präparat wurde eine Kombination der APAAP und der PAP-Methode angewandt. Hierzu erfolgt zunächst der Nachweis von Kollagen I mittels der PAP-Methode, wie oben beschrieben. Im Anschluss wurde die Darstellung von Kollagen II mittels der APAAP Methode am selben Präparat durchgeführt. Kollagen I erscheint bräunlich gefärbt, Kollagen II rot.

4.3. Statistische Auswertung

Da es sich bei den erhobenen Daten um verbundene Stichproben handelte, wurden zur statistischen Auswertung die Wertdifferenzen der Versuchskulturen in Beziehung zu den Standardabweichungen in den Kontrollkulturen gesetzt. Bei einer normalverteilten Größe weichen rund 60% aller Werte um mehr als eine halbe Standardabweichung vom Mittelwert ab und rund 80% um mehr als eine viertel Standardabweichung. Das Verhältnis der mittleren Wertdifferenz (Δ -Wert) zwischen Kontroll- und Versuchskulturen zur Standardabweichung in den Kontrollkulturen ist ein Maß für den Einfluss der variierten Größe.

Des weiteren wurde der F-Test verwendet, um zu überprüfen, ob sich die Standardabweichungen in Kontroll- und Versuchskulturen deutlich unterscheiden.

Die Berechnung der Werte und Erstellung der entsprechenden Diagramme erfolgte mit dem Computerprogramm Excel2000[®] von Microsoft[®].

5. Ergebnisse

5.1. Wachstum frisch isolierter Chondrozyten in der Monolayerkultur

5.1.1. Chondrozytenisolierung und Vitalität

In einer Reihe von Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Verwendung von arthroskopisch entnommenem Kniegelenksknorpel keine verwertbaren Ergebnisse lieferte. Wurde mit diesen Knorpelproben die Chondrozytenisolierung wie unter 2.2.2 durchgeführt, fanden sich im Anschluss lediglich 12,7% vitale Chondrozyten und eine im Verhältnis zu Größe und Gewicht der entnommenen Knorpelprobe deutlich geringere Zellzahl als bei Nasenseptumknorpel. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Chondrozyten aus vitalem humanen Nasenseptumknorpel verwendet. Die Knorpelproben wurden unter sterilen Bedingungen im Operationssaal entnommen und anschließend wie unter Punkt 2.2.2. beschrieben weiterverarbeitet. Die aus Nasenseptumknorpel gewonnenen Chondrozyten zeigten nach dem Enzymverdau im Mittel eine Vitalität von 85,9%.

5.1.2. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf Zellzahl und Vitalität frisch isolierter Chondrozyten in der Monolayerkultur

Einen Tag nach dem Enzymverdau wurden die Monolayerkulturen erstmals passagiert. Hierbei zeigte sich im Mittel eine Vitalität der Chondrozyten von 94,95%. Daraufhin wurden jeweils 500.000 Chondrozyten in eine T-25 Kulturflasche eingebracht und in 2 Gruppen über 15 Tage kultiviert: Eine Gruppe unter dem Einfluss eines extrem niederfrequenten sinusoidalen elektromagnetischen Feldes (6,0 - 7,5 mT), die Kontrollgruppe unter normalen Brutschrankbedingungen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche untereinander erfolgte die Passagierung am 5., 10., und 15. Tag der Monolayerkultur, auch wenn noch keine vollständige Konfluenz des Zellrasens erreicht war.

Bei jeder Passage wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt. Bei den frisch isolierten Chondrozyten stiegen die Zellzahlen (in Millionen) der Kontroll-Kulturen im

Mittel von 0,5 über 1,7 und 3,72 auf schließlich 6,1. Bei den ELF-EMF- befeldeten Kulturen lauten diese Zahlen (für den 1., 5., 10. und 15. Tag): 0,5, 1,63, 3,26 und 5,64. Es zeigte sich also eine geringere Vermehrung bei den Zellen mit Magnetfeldbehandlung.

Die Differenz der Zellzahlen in den Vergleichskulturen betrug dabei im Mittel 0,07, 0,47 und 0,46 Millionen (am 5., 10. und 15. Tag), während die Standardabweichungen der Kontroll-Kulturen bei 0,41, 1,38 und 1,71 lagen. Die Wertänderung betrug somit weniger als etwa ein Drittel der Standardabweichung und ist damit nicht sehr ausgeprägt. Die empirischen Standardabweichungen der Kontroll- und Magnetfeld-Kulturen sind von gleicher Größenordnung; ihre Unterschiede sind somit nicht signifikant (f-Werte von 1,09, 1,61 und 1,14) (Abb. 4).

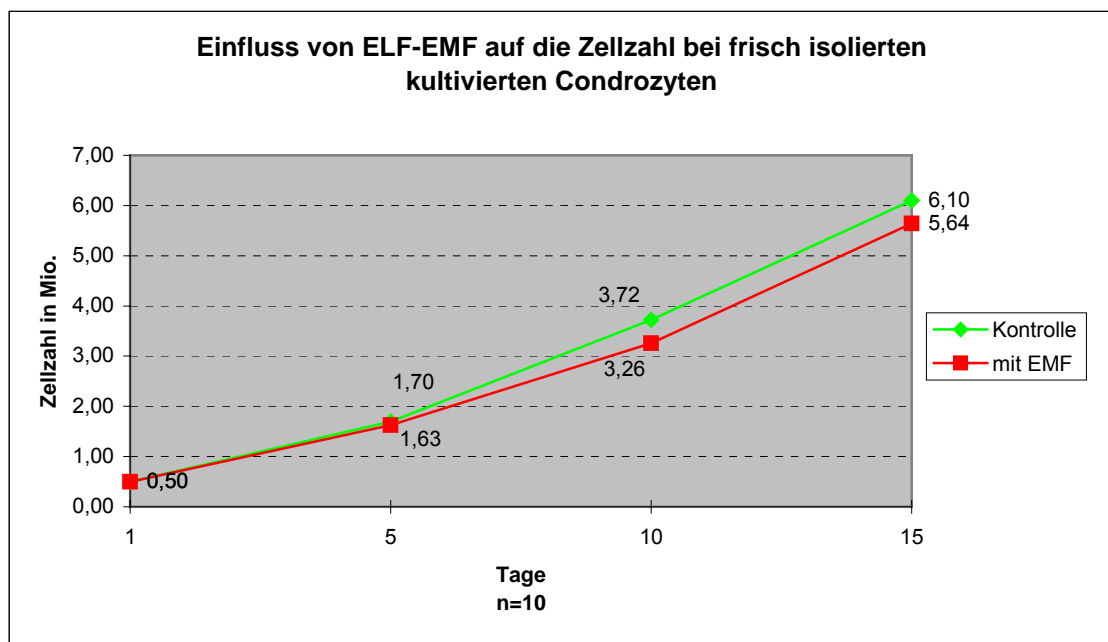


Abb. 4: Entwicklung der Zellzahl über 15 Kulturtage unter Einfluss von elektromagnetischen Feldern. Keine signifikante Senkung der Zellzahl durch das ELF-EMF, f- Werte: 1,09 (5. Tag), 1,61 (10. Tag) und 1,14 (15. Tag)

In bezug auf die Vitalität zeigten sich in beiden Gruppen vergleichbare, konstant hohe Werte, wobei sie in der ELF-EMF-befeldeten Gruppe geringfügig höher lag, ohne jedoch eine statistische Signifikanz aufzuweisen. Die mittleren Wertunterschiede der Versuchsgruppe waren im Vergleich zur Standardabweichung sehr gering (Δ -Wert < Standardabweichung/2) (Abb. 5).

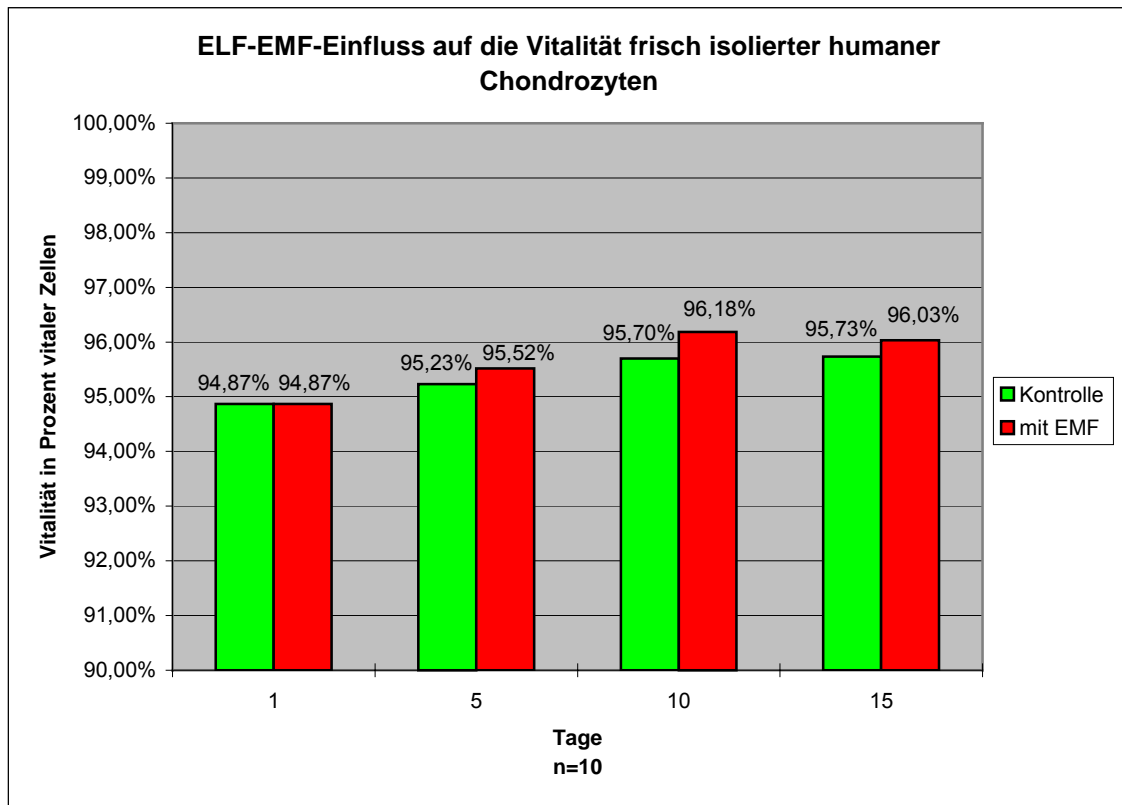


Abb. 5: Vitalität der kultivierten Chondrozyten über 15 Kulturtage unter Einfluss von elektromagnetischen Feldern.

5.1.3. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Proliferation frisch isolierter Chondrozyten

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der kultivierten Chondrozyten unter ELF-EMF-Einfluss wurden qualitative und quantitative Verfahren angewandt. Die einfache Darstellung eines Proliferationsvorgangs erfolgte mittels immunhistochemischer Anfärbung der in der Monolayerkultur mit und ohne ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten mit dem Proliferationsmarker Ki-67. Ferner wurde mit Hilfe der direkten Immunperoxidase-Methode das während der Proliferationsphase in den Zellkern eingebaute Thymidinanalogon 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) detektiert. Mit diesen beiden Verfahren konnte ein qualitativer Proliferationsnachweis erbracht werden. Es zeigten sich in den einzelnen Gruppen keine erkennbaren Unterschiede im Wachstumsverhalten (Abb. 6 bis 9).

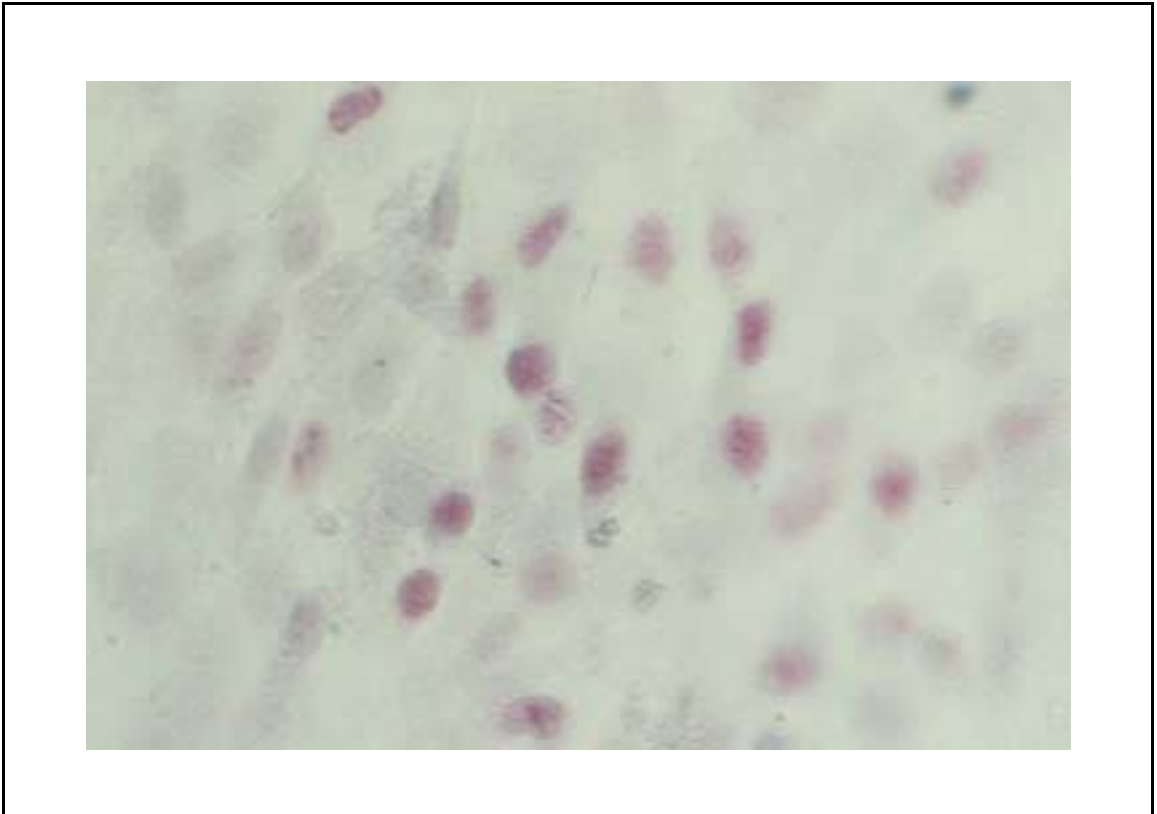


Abb. 6: Proliferationsnachweis frisch isolierter Chondrozyten der Kontrollgruppe mit der Ki-67-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot angefärbt, Vergrößerung x 400

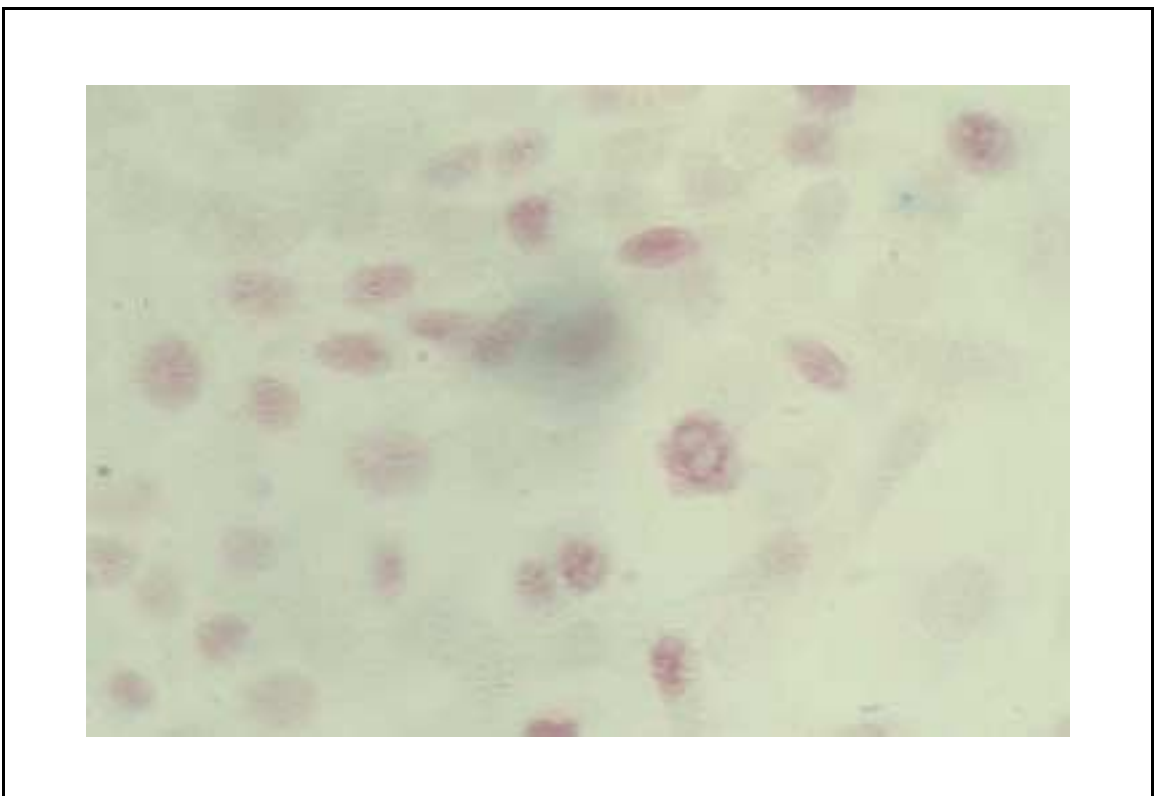


Abb. 7: Proliferationsnachweis frisch isolierter Chondrozyten der Versuchsgruppe mit der Ki-67-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot angefärbt, Vergrößerung x 400

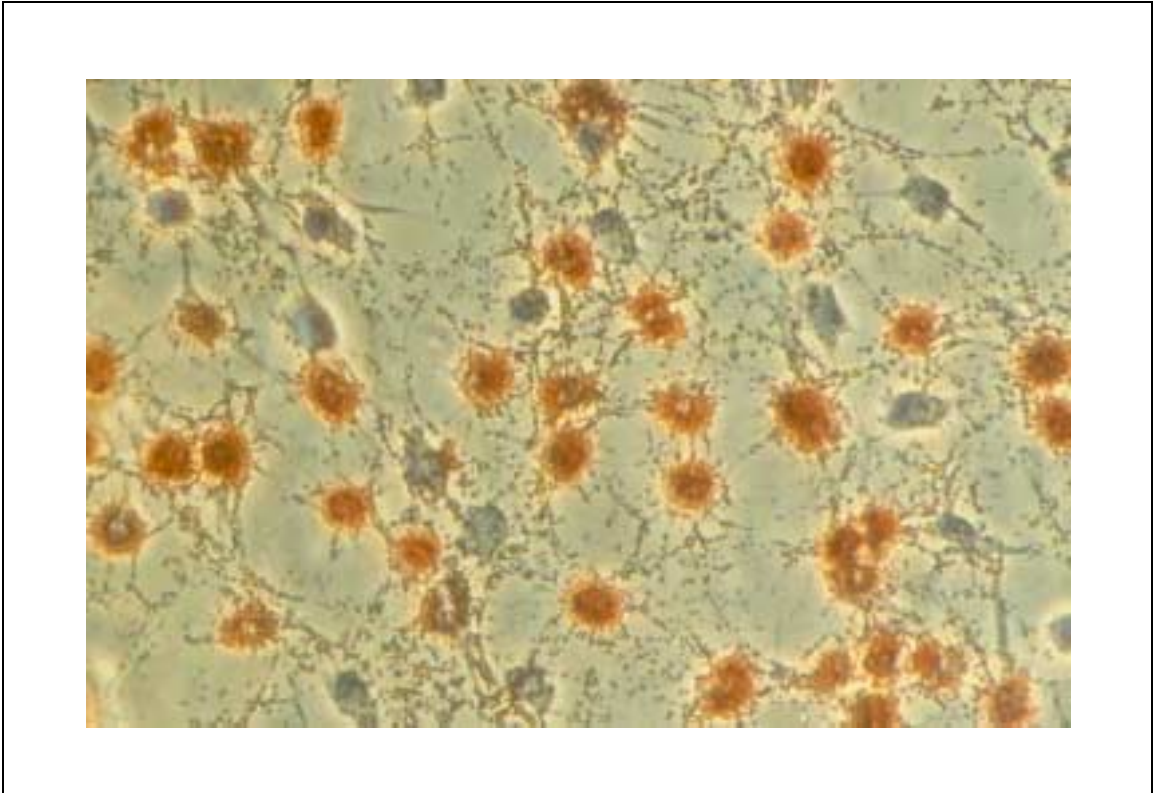


Abb. 8: Proliferationsnachweis frisch isolierter Chondrozyten der Kontrollgruppe mit der BrdU-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot-orange angefärbt, Vergrößerung x 400, Phasenkontrastmikroskopie

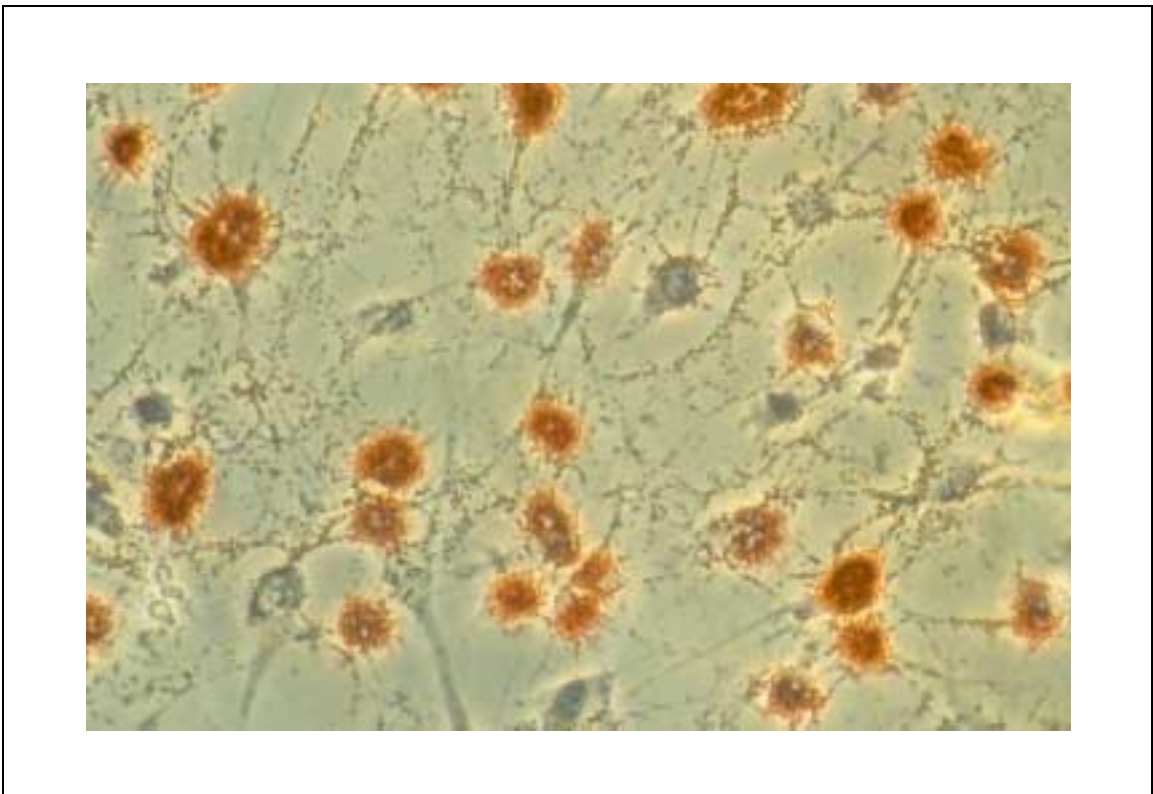


Abb. 9: Proliferationsnachweis frisch isolierter Chondrozyten der Versuchsgruppe mit der BrdU-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot-orange angefärbt, Vergrößerung x 400, Phasenkontrastmikroskopie

Als quantitatives Verfahren zur Darstellung der Proliferation wurde ein ELISA verwendet, mit dem BrdU, das während des S-Phase des Zellzyklus in den Zellkern inkorporiert wird, indirekt photometrisch dargestellt werden kann. Das Maß der Extinktion ist direkt proportional zu Proliferationsrate der Chondrozyten (vgl. 2.3.).

Die erhaltenen Werte zeigten bei den frisch isolierten Zellen eine leicht verminderte Proliferation der ELF-EMF-befeldeten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung ergab für die Werte zwischen Kontroll- und Versuchskulturen einen hohen Korrelationskoeffizienten von 0,924. Die Standardabweichung betrug für die Kontrollkultur 0,355, für die ELF-EMF-befeldeten Kulturen 0,327. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2% (f-Wert: 1,176) ist dieser Unterschied im Proliferationsverhalten jedoch nicht signifikant (Abb. 11).

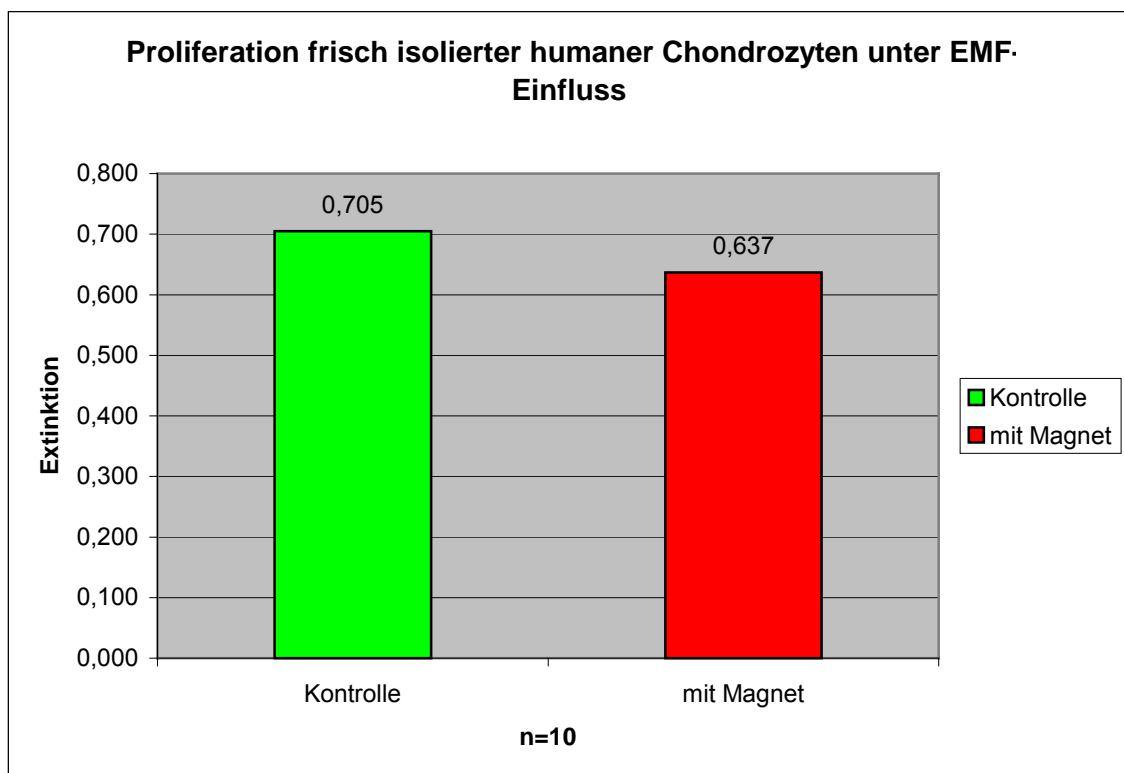


Abb. 11: Darstellung der BrdU-Inkorporation und somit Proliferation der Chondrozyten unter dem Einfluss des elektromagnetischen Feldes; nicht signifikante Proliferationsminderung in der Kontrollkultur (f-Wert: 1,176).

5.1.4. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Synthese von spezifischen Proteinen der frisch isolierten Chondrozyten

5.1.4.1. Untersuchung der Synthese von Kollagen I und II

Neben dem Proliferationsverhalten und der Vitalität der kultivierten humanen Chondrozyten ist die Synthese von knorpelspezifischen Matrixproteinen von vorrangiger Bedeutung für das Tissue Engineering. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Bildung von Kollagen. Der Einfluss des extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldes auf die Bildung von Kollagen I und II wurde mit immunhistochemischen Verfahren untersucht. Zusätzlich wurde zur Bestimmung des Kollagengehaltes im Mediumüberstand ein ELISA eingesetzt. Dieser basiert auf der Reaktion eines roten Farbstoffs (Sirius Red), der mit den Seitenketten des Kollagens Bindungen eingeht. Die Menge des gebundenen Farbstoffs ist proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Kollagens und lässt sich photometrisch bestimmen.

Die Fähigkeit der Chondrozyten, in der Monolayerkultur das knorpelspezifische Kollagen II zu synthetisieren, nimmt mit zunehmender Kultivierungsdauer ab (Dedifferenzierung). Nach einwöchiger Kultivierung wurde untersucht, ob es durch den Einfluss des elektromagnetischen Feldes zu einer Veränderung des Dedifferenzierungsverhaltens gekommen war. Hierzu wurden Färbungen mit der APAAP-Methode durchgeführt, um Kollagen II zu detektieren. Ferner erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der Präparate, in der nacheinander mit Antikörper gegen Kollagen I und II inkubiert wurde, so dass an einem Präparat beide Kollagenarten nachgewiesen werden konnten (Doppelfärbung). Es waren nach sieben Tagen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der ELF-EMF-befeldeten Gruppe noch Zellen nachweisbar, die Kollagen II produzierten. Daneben fanden sich Zellen, die bereits Kollagen I synthetisierten, wobei zwischen den Kontrollkulturen und den ELF-EMF-befeldeten Kulturen keine Unterschiede festgestellt werden konnten (Abb. 12-15).

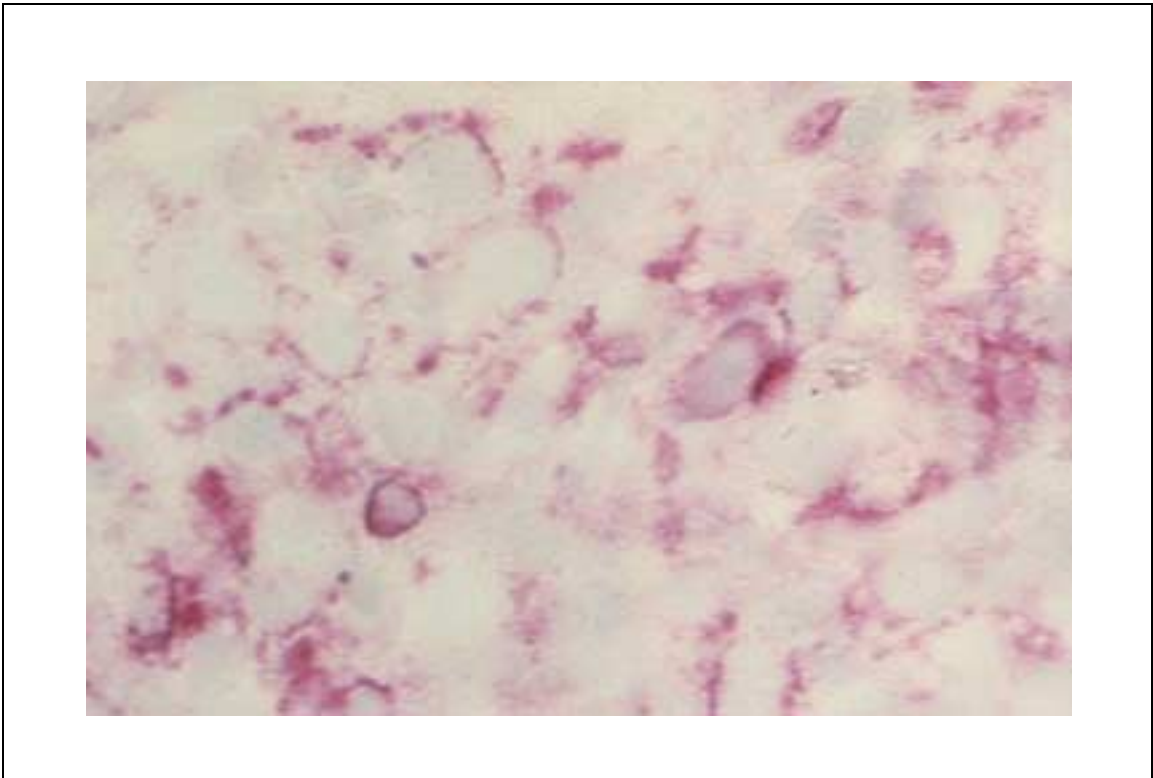


Abb. 12: APAAP-Färbung, anti-Kollagen II-AK, interzelluläres Kollagen II stellt sich hellrot dar, 7. Tag Monolayerkultur, Kontrollgruppe, Vergrößerung x 400

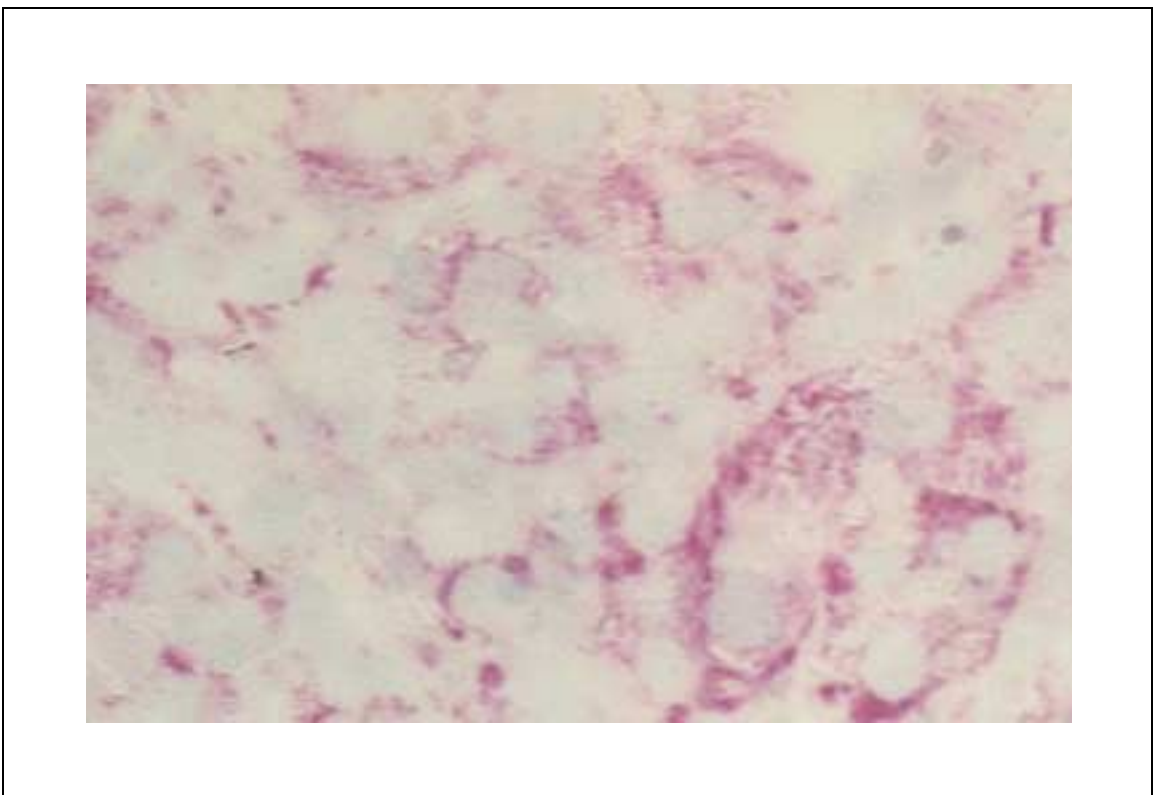


Abb. 13: APAAP-Färbung, anti-Kollagen II-AK, interzelluläres Kollagen II stellt sich hellrot dar, 7. Tag Monolayerkultur unter ELF-EMF- Einfluss, Vergrößerung x400

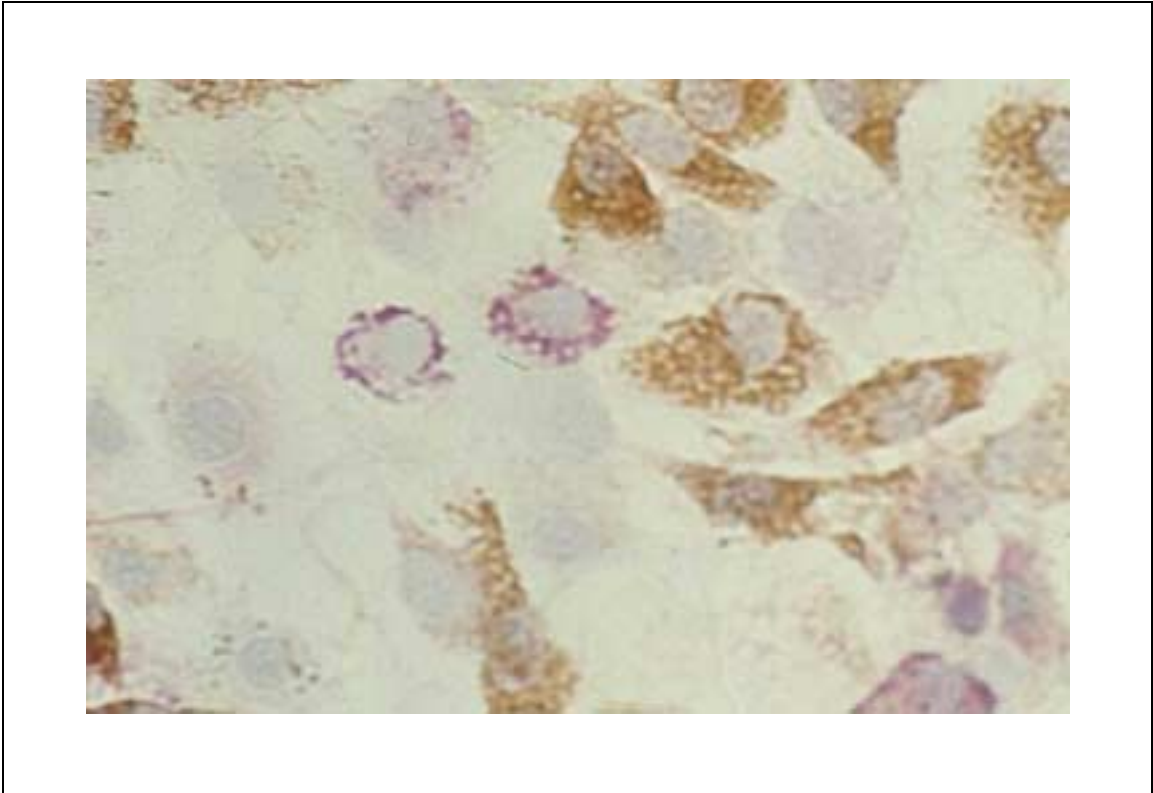


Abb. 14: Doppelfärbung, anti-Kollagen I und II-AK, Kollagen I braun, Kollagen II rot 7. Tag Monolayerkultur Kontrollgruppe, Vergrößerung x400

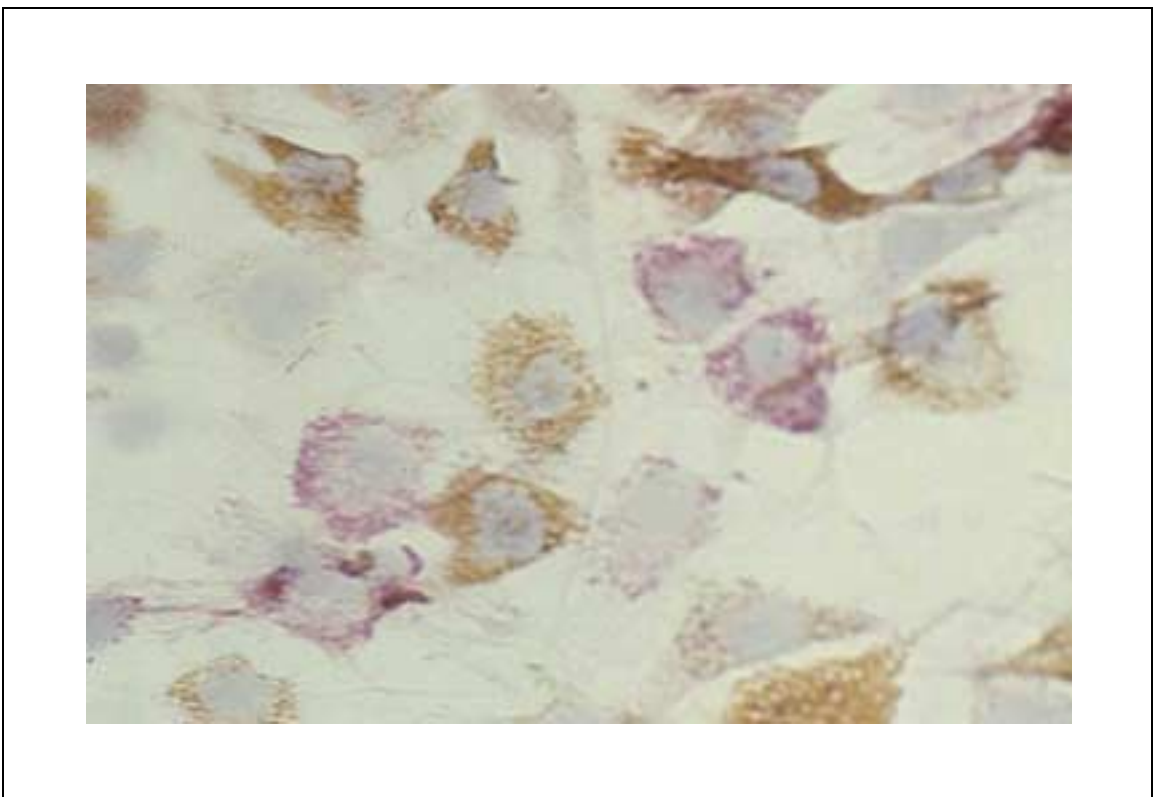


Abb. 15: Doppelfärbung, anti-Kollagen I und II-AK, Kollagen I braun, Kollagen II rot 7. Tag Monolayerkultur unter ELF-EMF- Einfluss, Vergrößerung x400

Bei der Untersuchung des Kollagengehaltes im Zellkulturüberstand zeigte sich in den durchgeführten Versuchen eine im Mittelwert erhöhte Kollagenproduktion pro Zelle in der Gruppe, die unter dem Einfluss des elektromagnetischen Feldes stand. Der Korrelationskoeffizient für die Kontroll- und die ELF-EMF-befeldeten Kulturen betrug 0,863. Die vorliegende Wertänderung lag bei knapp einem Drittel der Standardabweichung. Der gemessene Unterschied ist somit statistisch nicht signifikant.

Mit dem verwendeten Analysesystem war eine quantitative Differenzierung zwischen Kollagen I und Kollagen II nicht möglich. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorangegangenen immunhistochemischen Analysen liegt der Schluss nahe, dass es zu einer Steigerung der gesamten Kollagensyntheserate gekommen ist, ohne Auswirkung auf das Verhältnis zwischen Kollagen Typ I und Kollagen Typ II (Abb. 16).

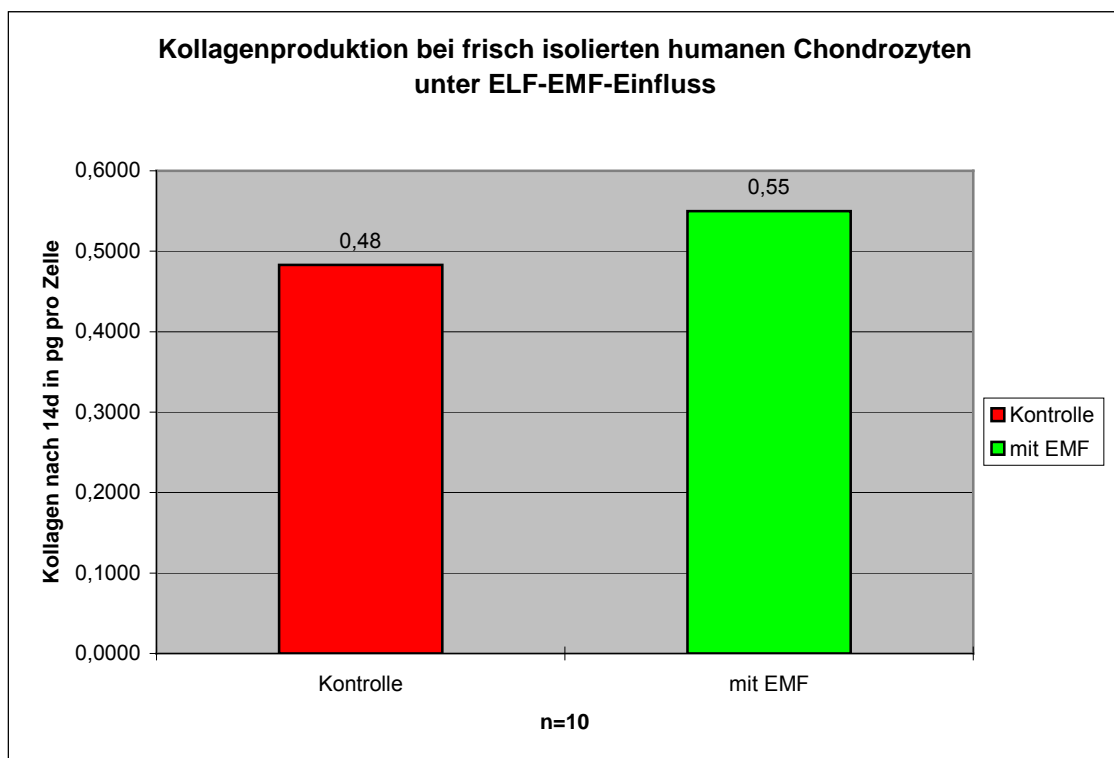


Abb. 16: Quantitative Analyse der Kollagensynthese mittels Sirius Red ELISA: statistisch nicht signifikante Steigerung der zellulären Kollagensynthese (Korrelationskoeffizient 0,863, Δ -Werte < Standardabweichung/3)

5.1.4.2. Untersuchung der Synthese von Chondroitin-6-phosphat

Neben der Synthese von Kollagen I und II wurde auch die Produktion des chondrozytenspezifischen Chondroitin-6-phosphates untersucht. Ähnlich wie beim Kollagen II wird die Synthese dieses Proteins von den Chondrozyten ebenfalls während der Amplifizierungsphase in der Monolayerkultur eingestellt. Die durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen ergaben bei den frisch isolierten Chondrozyten keine erkennbaren Unterschiede in der Syntheseleistung bei der Kontrollgruppe und den ELF-EMF-befeldeten Zellen (Abb. 17, 18).

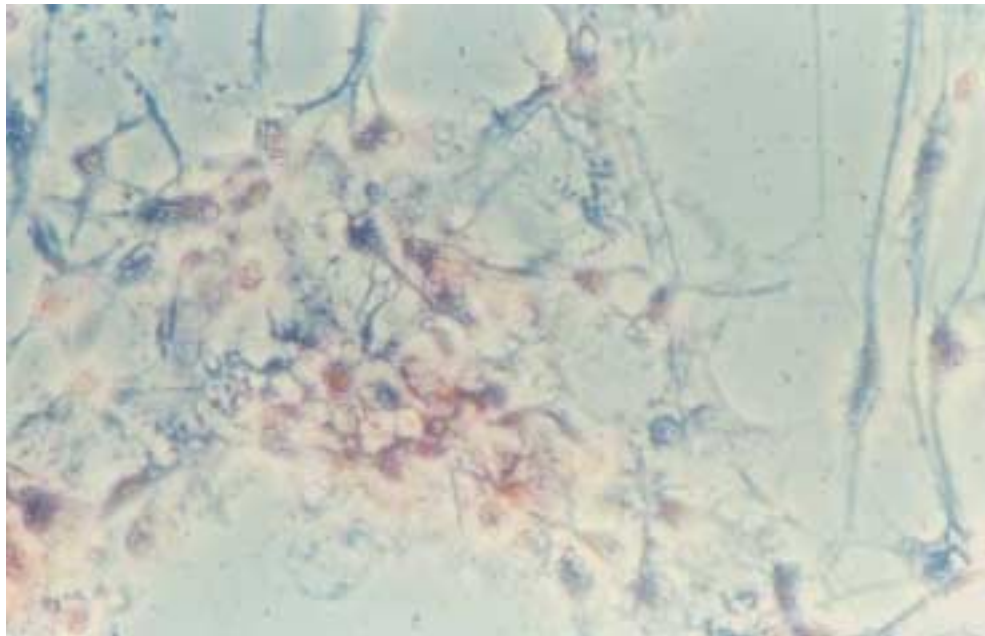


Abb. 17: Nachweis von Chondroitin-6-phosphat (rot) bei 7 Tage kultivierten Chondrozyten der Kontrollgruppe, Vergrößerung x 200

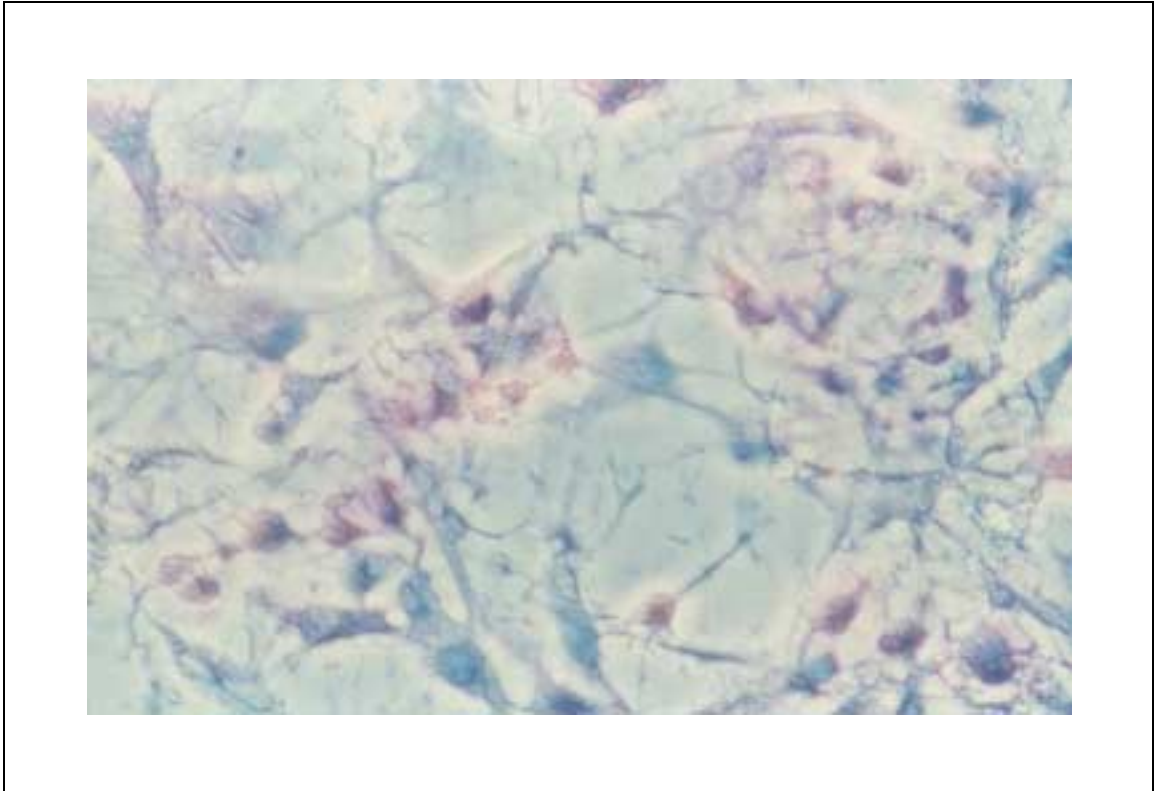


Abb. 18: Nachweis von Chondroitin-6-phosphat (rot) bei 7 Tage unter ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten, Vergrößerung x 200

5.1.4.3. Untersuchung der Oberflächenantigene

Neben der Synthese von Matrixproteinen sind die von den Zellen exprimierten Oberflächenantigene von erheblicher Bedeutung für das Tissue Engineering. Sie können Leukozyten andocken und eine zelluläre Entzündungsreaktion hervorrufen, die zum Verlust der inserierten Implantate führen kann.

ICAM I wird von isolierten humanen Chondrozyten exprimiert und fungiert als Ligand für Lymphozyten. Die Expression dieses Oberflächenantigens fand sich sowohl bei den Kontrollkulturen, als auch bei den ELF-EMF-befeldeten Kulturen, ohne dass in der Ausprägung der Expression ein Unterschied erkennbar war (Abb. 19,20).

Oberflächenantigene der HLA Klasse II treten bei kultivierten Chondrozyten nur bei Stimulation mit Entzündungsmediatoren, z.B. Gamma-Interferon (IFN- γ) auf. Sie wurden von kultivierten humanen Chondrozyten weder in den Kontroll-, noch in den Versuchskulturen exprimiert (Abb. 21,22).

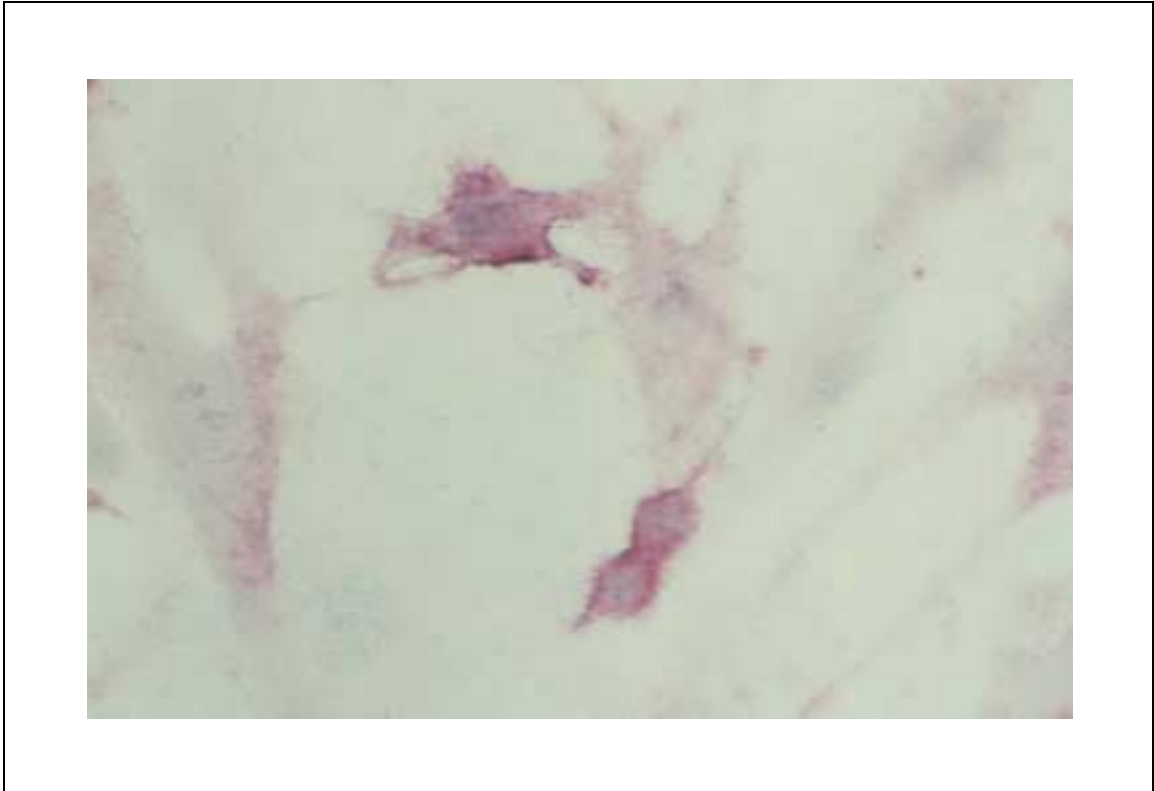


Abb. 19: Nachweis von ICAM I (rot) bei 7 Tage kultivierten Chondrozyten der Kontrollgruppe, Vergrößerung x 400

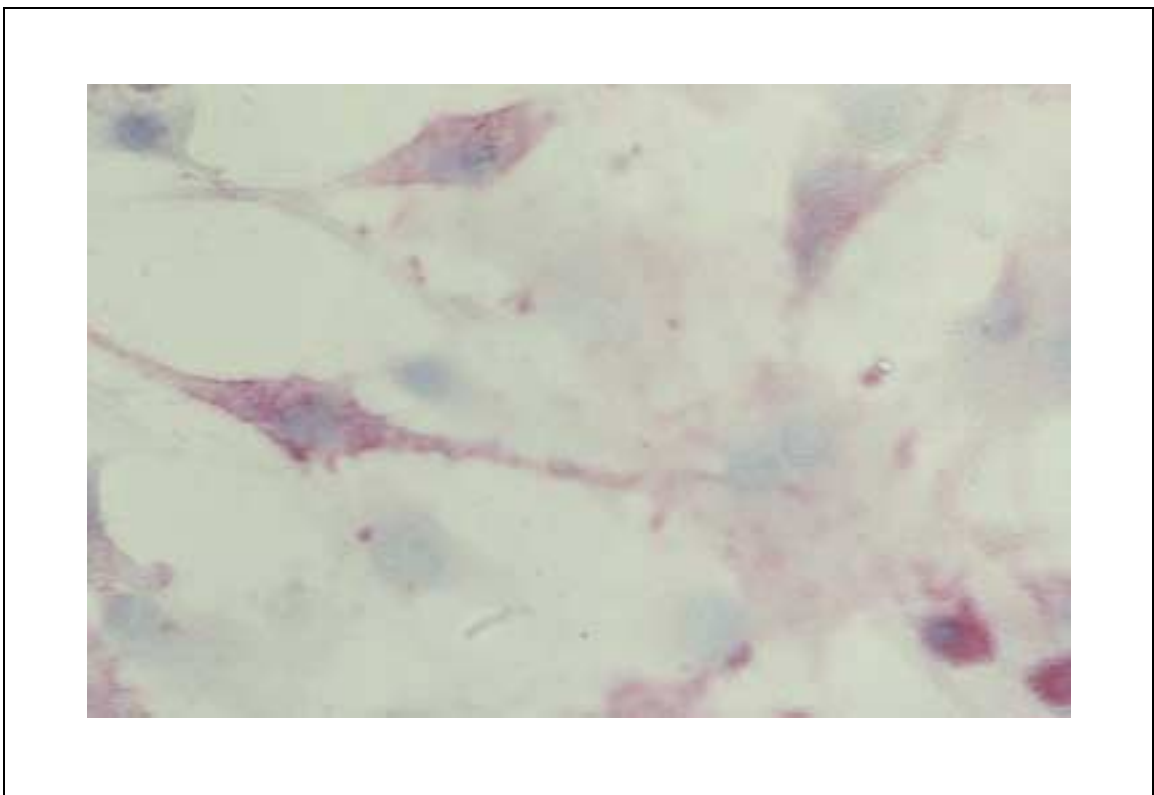


Abb. 20: Nachweis von ICAM I (rot) bei 7 Tage unter ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten, Vergrößerung x 400

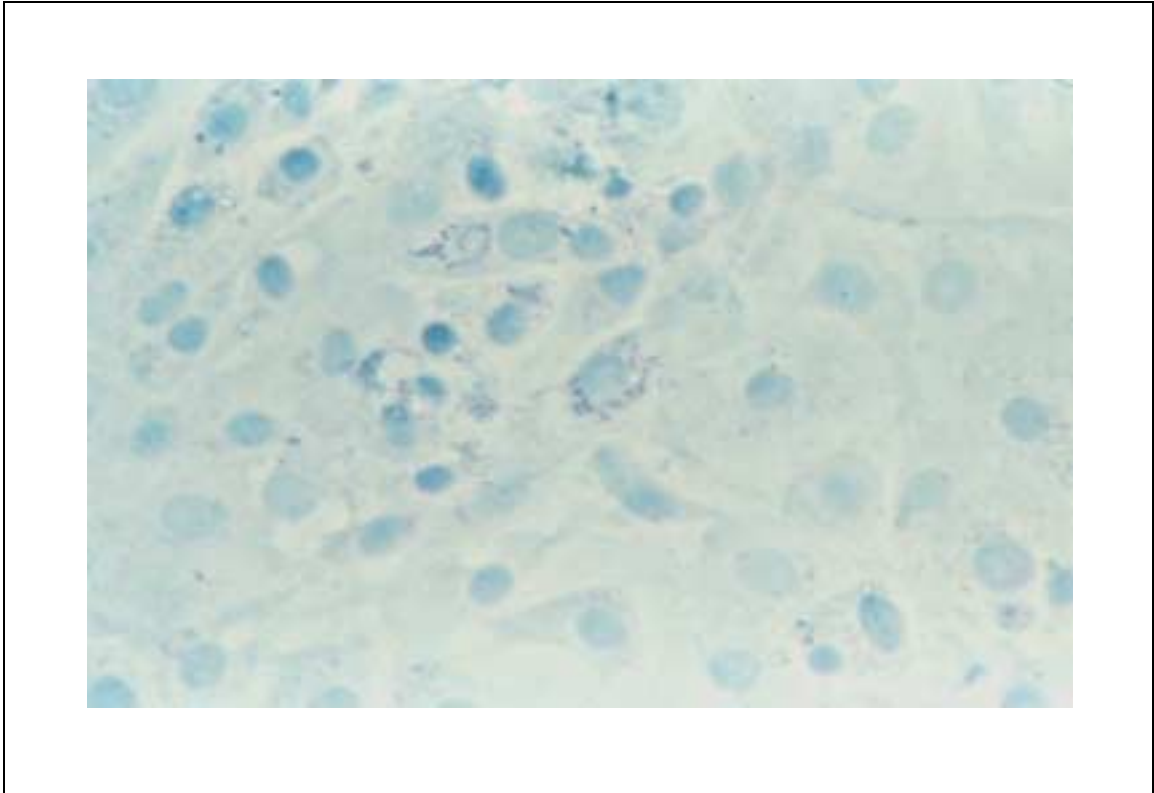


Abb. 23: Fehlender Nachweis von HLA II bei 7 Tage kultivierten Chondrozyten der Kontrollgruppe, Vergrößerung x 200

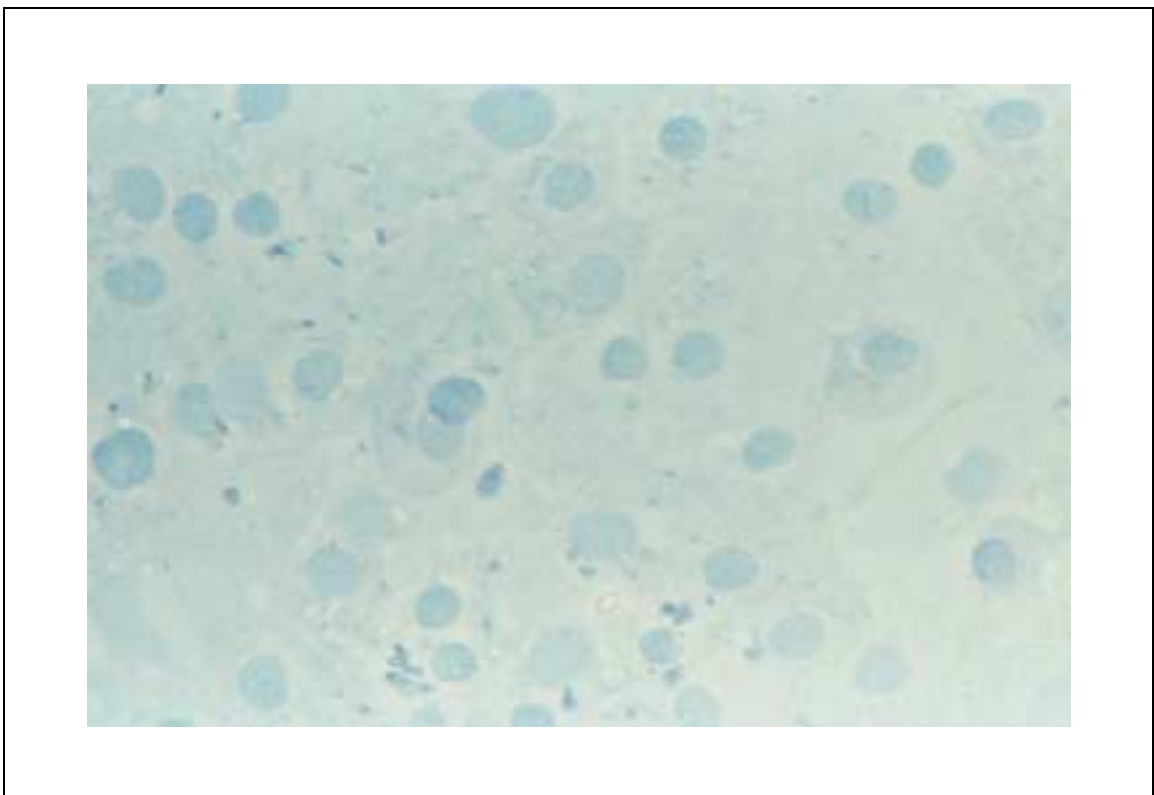


Abb. 24: Fehlender Nachweis von HLA II bei 7 Tage unter ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten, Vergrößerung x 200

5.2. Wachstum dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur

5.2.1. Vitalität kryokonservierter dedifferenzierter Chondrozyten

Zur Untersuchung der Einflüsse des elektromagnetischen Feldes auf dedifferenzierte Chondrozyten wurden Zellen verwendet, die zunächst mehrere Wochen in der Monolayerkultur amplifiziert worden waren. Anschließend wurden die Chondrozyten kryokonserviert. Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen aufgetaut und erneut in Kultur gebracht. Hierbei zeigte sich nach dem Auftauen im Durchschnitt eine Vitalität von 82,7 %. In drei Fällen zeigte sich jedoch am ersten Tag der Kultivierungsphase in der Monolayerkultur, dass es nicht zur Adhärenz der Zellen am Boden der Kulturflasche gekommen war. In diesen drei Fällen wurden die Proben verworfen und nicht zur Durchführung von Versuchen verwendet.

5.2.2. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf Zellzahl und Vitalität dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur

Analog zum Vorgehen bei den frisch isolierten Knorpelzellen wurden auch die dedifferenzierten Chondrozyten am Tag nach dem Auftauen erstmals passagiert. Hierbei zeigte sich eine Vitalität von 93,9 %. Es wurden ebenfalls jeweils 500.000 Chondrozyten in eine T-25 Kulturflasche eingebracht und in 2 Gruppen über 15 Tage kultiviert. Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgte am 8. und 15. Versuchstag. Bei den Kontrollkulturen betrugen die mittleren Zellzahlen 0,5, 2,92 und 4,89 Millionen Zellen. Demgegenüber fanden sich bei den ELF-EMF-befeldeten Kulturen Werte von 0,5, 3,07 und 5,12 Millionen Zellen. Die mittlere Zellzahl war also zu beiden Bestimmungszeitpunkten in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die mittlere Differenz der Zellzahlen in den Vergleichskulturen betrug hier $-0,15$ und $-0,23$ Millionen. Diese Werte betrugen jeweils weniger als $1/6$ der Standardabweichung in den Kontrollkulturen, die bei 0,896 am 8. Tag bzw. bei 1,378 am 15. Tag lag und damit praktisch unbedeutend war. Die Unterschiede der Standardabweichung in den Kontroll- und Versuchs-Kulturen sind nicht signifikant (f-Werte von 1,06 und 1,12) (Abb. 25).

Die Vitalität zeigte Werte von rund 95%, wobei die Vitalität der Kontrollgruppe leicht über der der Versuchsgruppe lag. Die mittleren Werteunterschiede betragen im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger als die halbe Standardabweichung und wiesen somit keine statistische Signifikanz auf: Die mittleren Werteunterschiede sind geringer als die halbe Standardabweichung (Abb. 26).

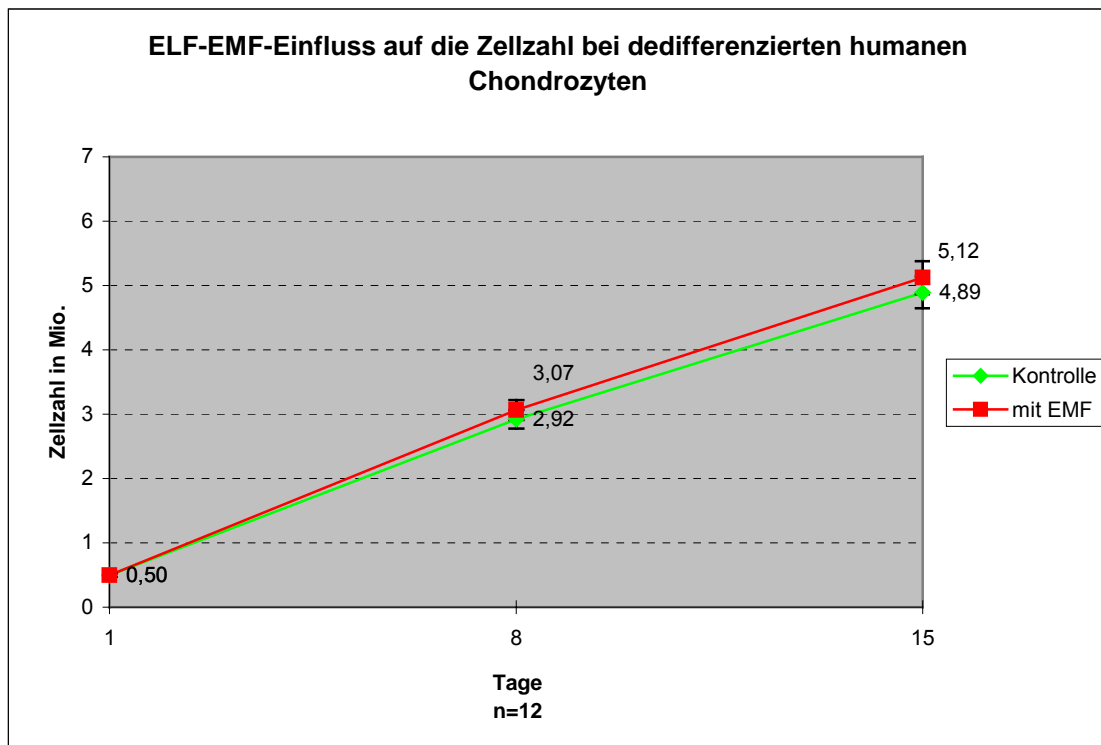


Abb. 25: Entwicklung der Zellzahl der dedifferenzierten Chondrozytenkultur über 15 Kulturtage unter Einfluss von elektromagnetischen Feldern: leichte, nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl bei den im ELF-EMF kultivierten Zellen; f-Werte: 1,06 (8. Tag) und 1,12 (15. Tag)

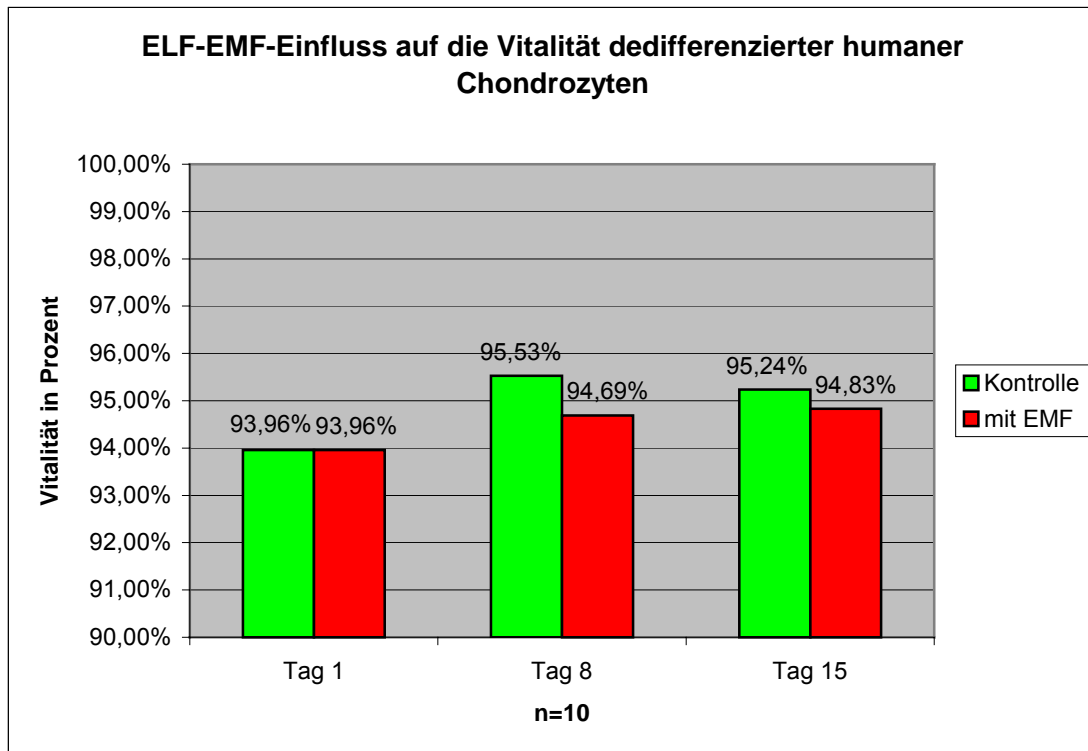


Abb. 26: Vitalität der dedifferenzierten kultivierten Chondrozyten über 15 Kulturtage unter Einfluss von elektromagnetischen Feldern: leicht erniedrigte Vitalitätswerte bei den ELF-EMF- kultivierten Zellen, ohne statistische Signifikanz (Δ -Werte < Standardabweichung/2).

5.2.3. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Proliferation dedifferenzierter Chondrozyten

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens der dedifferenzierten Chondrozyten kamen die gleichen Untersuchungsverfahren zum Einsatz, wie bei den frisch isolierten Knorpelzellen. Der direkte Proliferationsnachweis gelang sowohl in der Kontroll- wie in der Versuchsgruppe wiederum mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und durch die Detektion von in die DNA eingebautem BrdU. In dieser quantitativen Analyse waren, wie schon bei den frisch isolierten Chondrozyten, keine Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen der Kontrollgruppe und den ELF-EMF- befeldeten Chondrozyten erkennbar (Abb. 27 bis Abb. 30).

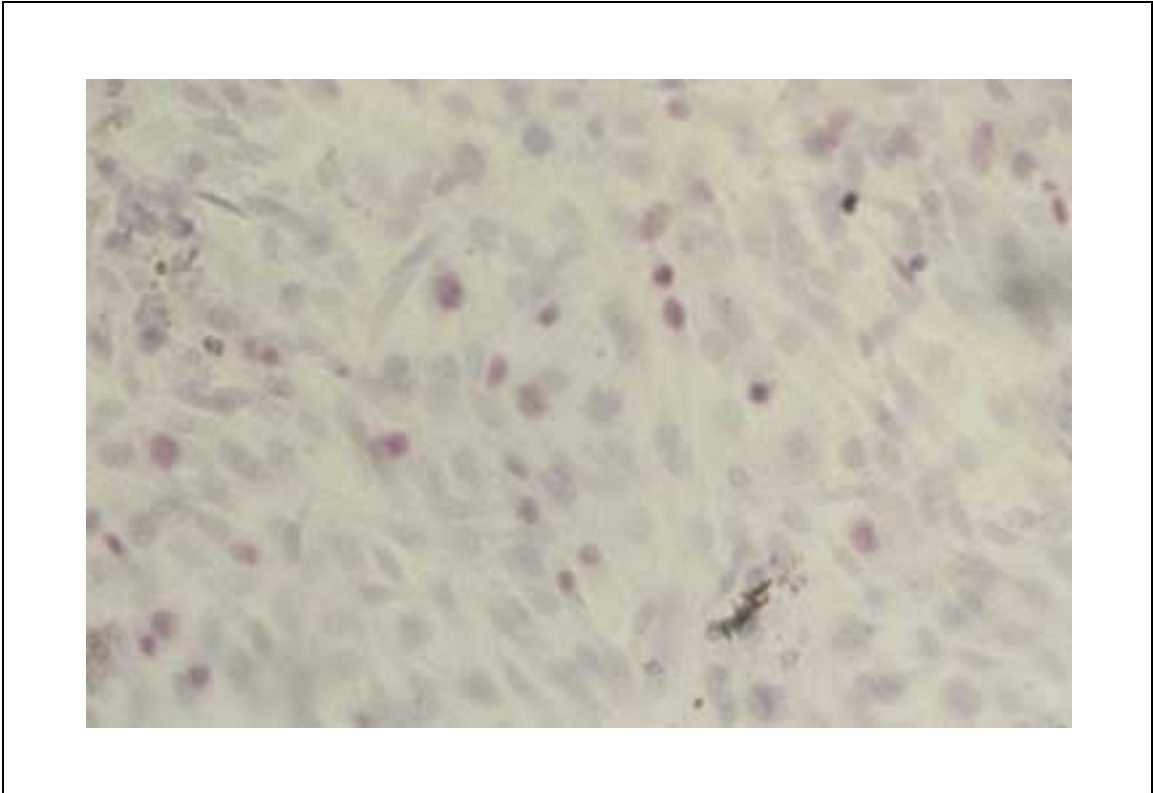


Abb. 27: Proliferationsnachweis dedifferenzierter Chondrozyten der Versuchsgruppe mit der Ki-67-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot angefärbt, Vergrößerung x 400

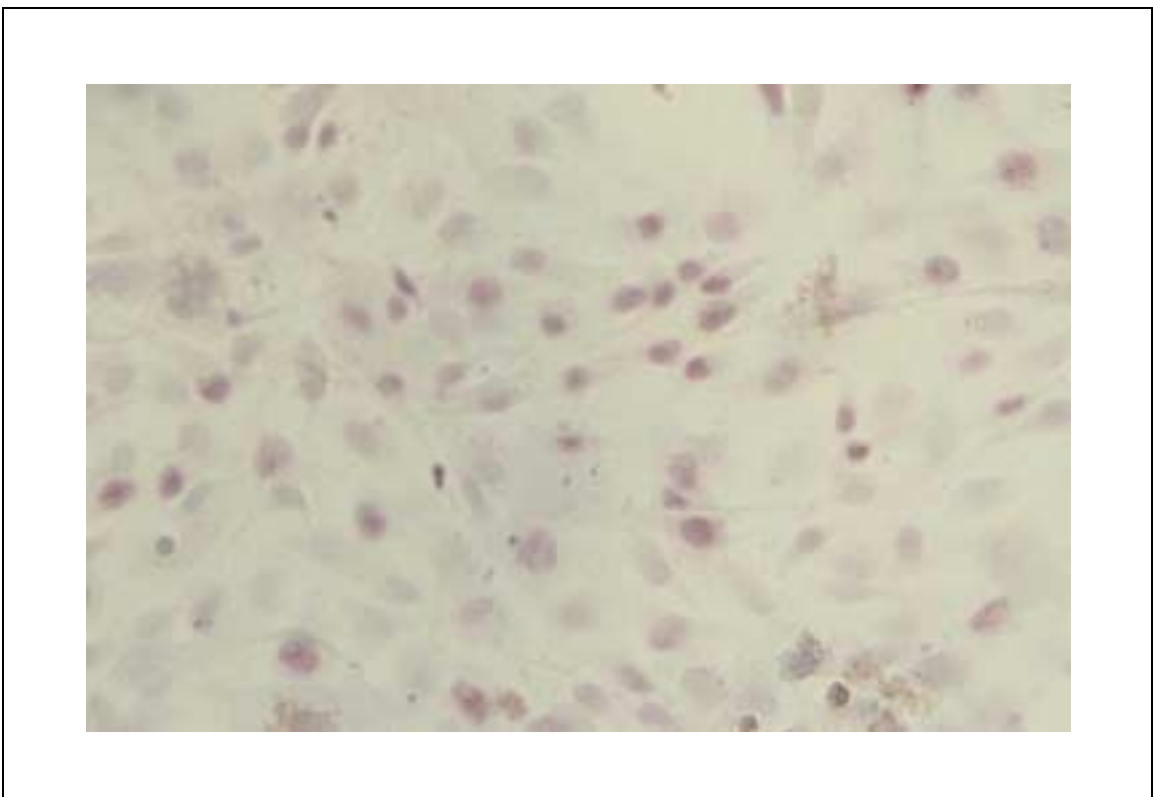


Abb. 28: Proliferationsnachweis dedifferenzierter Chondrozyten der Versuchsgruppe mit der Ki-67-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot angefärbt, Vergrößerung x 400

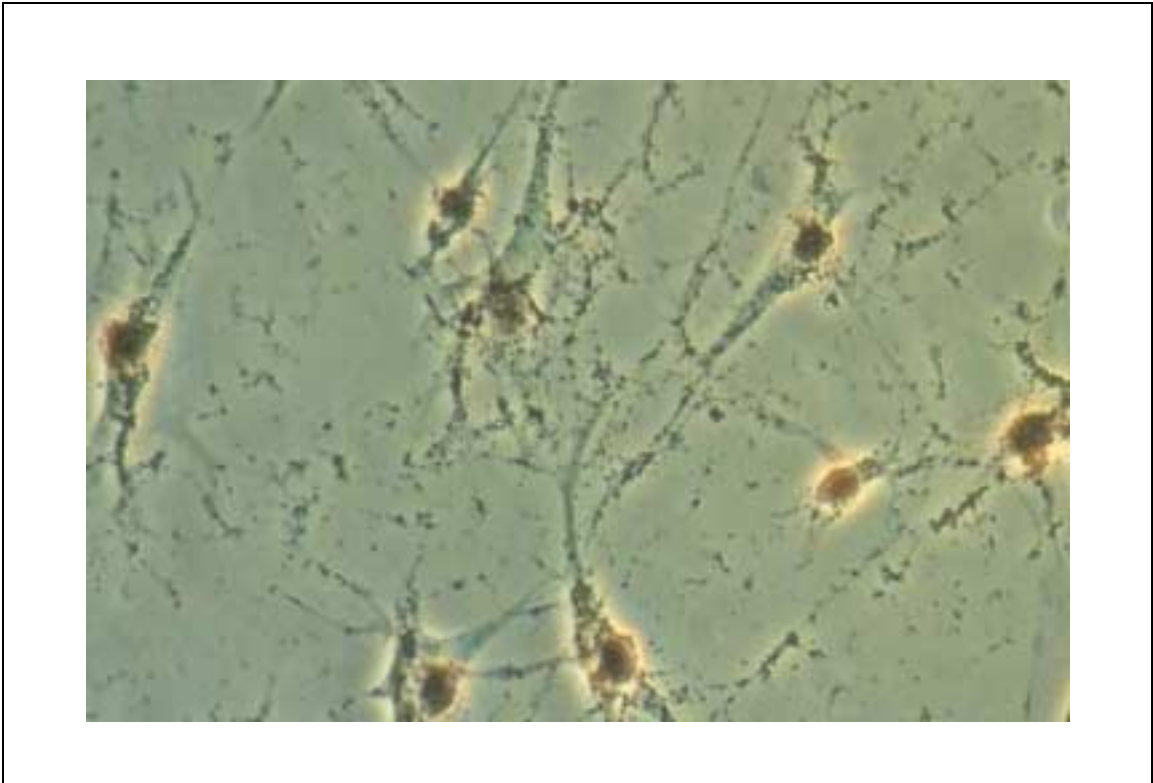


Abb. 29: Proliferationsnachweis dedifferenzierter Chondrozyten der Kontrollgruppe mittels BrdU-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot-orange angefärbt, Vergrößerung x 400, Phasenkontrastmikroskopie

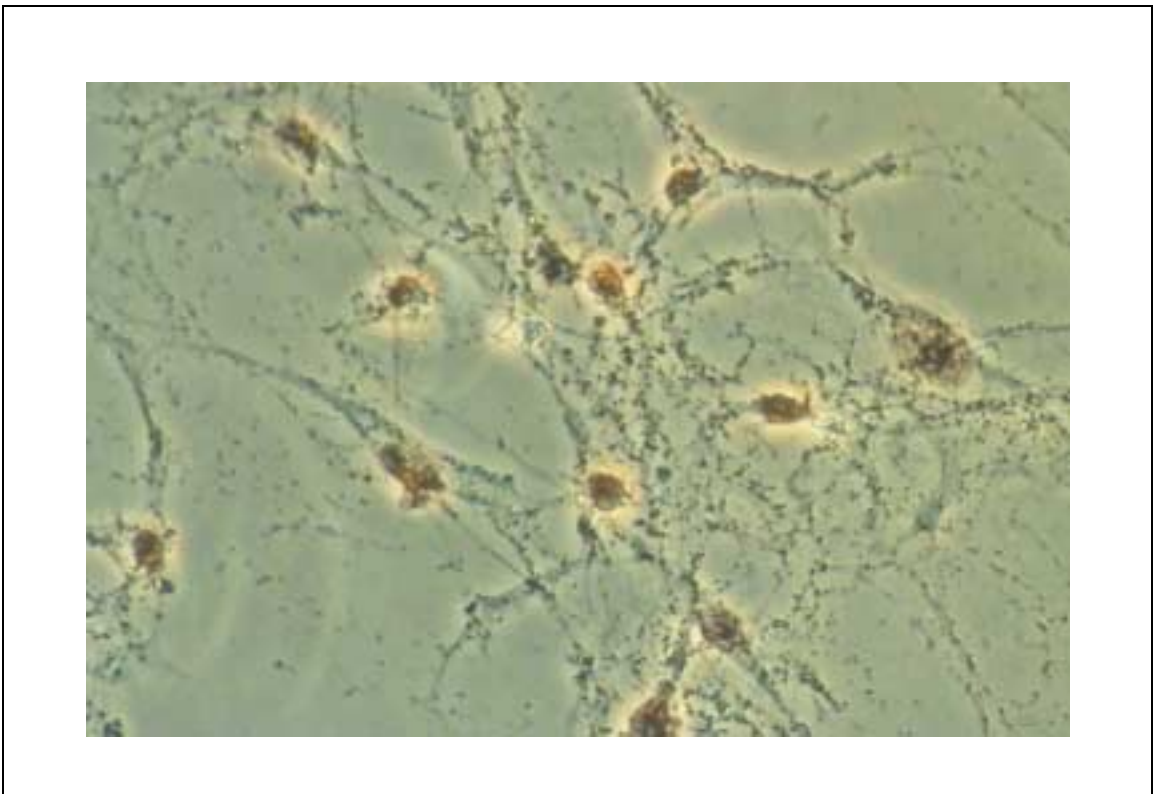


Abb. 30: Proliferationsnachweis frisch isolierter Chondrozyten der Versuchsgruppe mittels BrdU-Färbung, proliferierende Zellkerne sind rot-orange angefärbt, Vergrößerung x 400, Phasenkontrastmikroskopie

Die quantitative Analyse des Proliferationsverhaltens wurde mit dem o.g. BrdU-ELISA durchgeführt. Es zeigte sich eine erhöhte Proliferation der ELF-EMF-befeldeten Zellkulturen. Die Auswertung der Werte ergab einen geringen Korrelationskoeffizienten von 0,609.

Die Standardabweichungen der Kontroll- und der Versuchs-Kulturen betragen 0,067 bzw. 0,045. Die Unterschiede sind somit, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2 %, aufgrund der geringen Korrelation nicht signifikant (f-Wert 2,441) (Abb. 31).

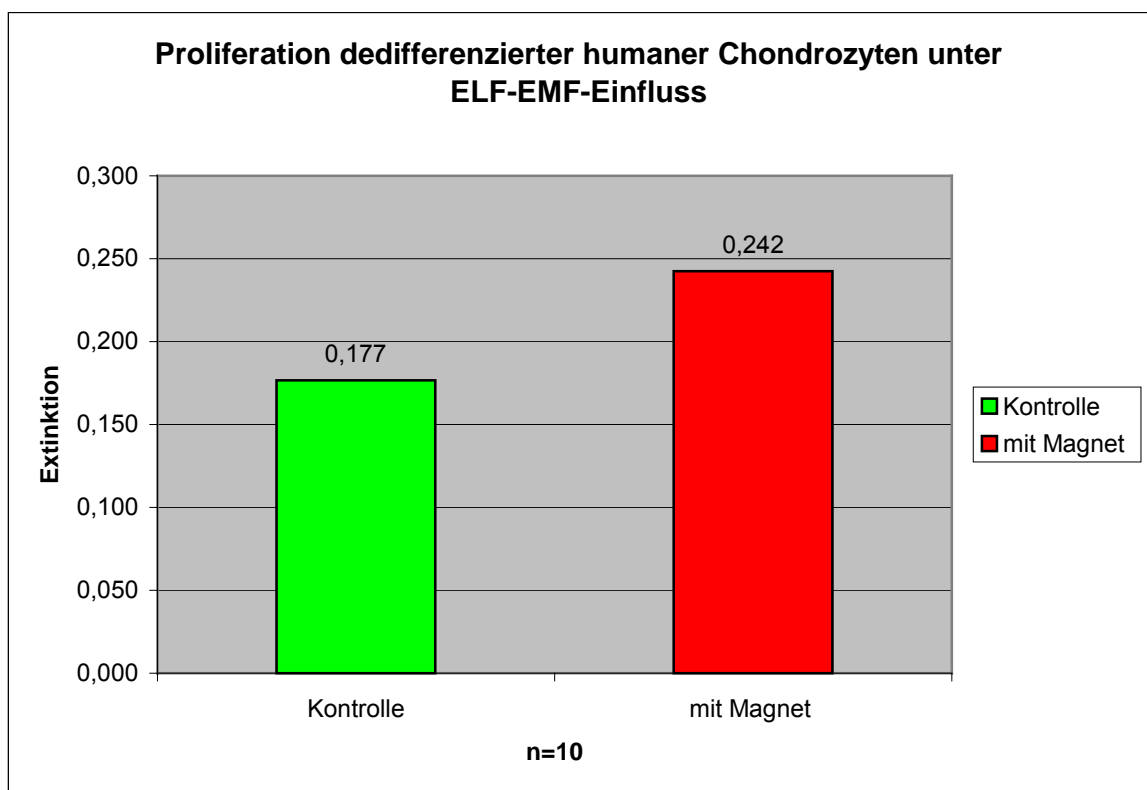


Abb. 31 Darstellung der BrdU-Inkorporation und somit Proliferation der dedifferenzierten Chondrozyten unter dem Einfluss des elektromagnetischen Feldes. Nicht-signifikante Proliferationssteigerung der Versuchsgruppe (f-Wert = 2,441)

5.2.4. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Synthese von spezifischen Proteinen der dedifferenzierten Chondrozyten

Analog zum Vorgehen bei frisch isolierten Chondrozyten wurde auch bei den dedifferenzierten Zellen die Synthese der unterschiedlichen, knorpelspezifischen Matrixproteine untersucht. Wichtig ist hierbei, ob es unter Einfluss des elektromagnetischen Feldes bei den dedifferenzierten fibroblastenartigen Zellen

zur erneuten Bildung von knorpelspezifischen Matrixproteinen kommt, was für einen Redifferenzierungsvorgang sprechen würde.

Es wurden für den Nachweis der synthetisierten Proteine dieselben Methoden und Antikörper verwandt wie bei den frisch isolierten Chondrozyten.

5.2.4.1. Untersuchung der Synthese von Kollagen I und Kollagen II

Zum Nachweis der synthetisierten Matrixproteine wurden die selben Detektionsverfahren verwandt wie bei den frisch isolierten Zellen.

Die immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen Kollagen I, Kollagen II und Kollagen I und II (Doppelfärbung) ergaben keinen Nachweis von Kollagen II mehr. Es ließ sich in allen Versuchen lediglich das für Fibroblasten charakteristische Kollagen I nachweisen (Abb. 32, 33).

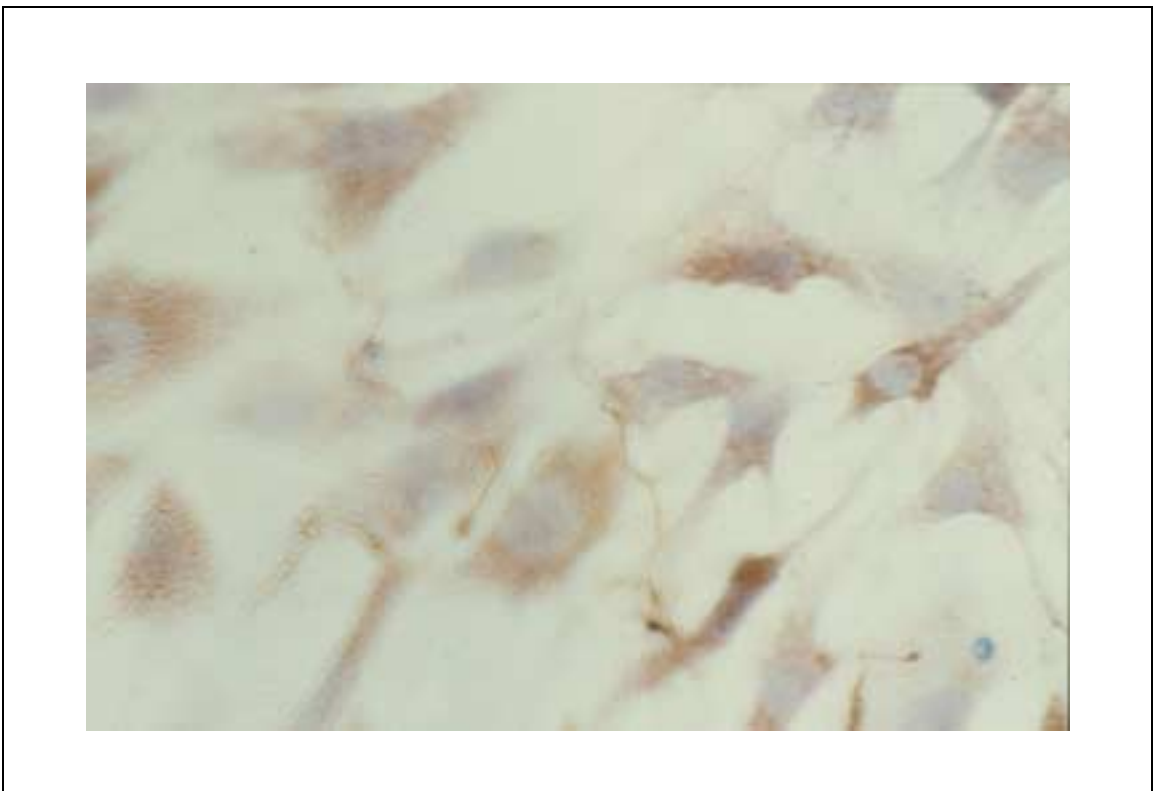


Abb. 32: Doppelfärbung mit anti-Kollagen I und II-AK, dedifferenzierte Chondrozyten, Kontrollgruppe, Vergrößerung x 400: nur Nachweis von fibroblastenspezifischem Kollagen I (braun)

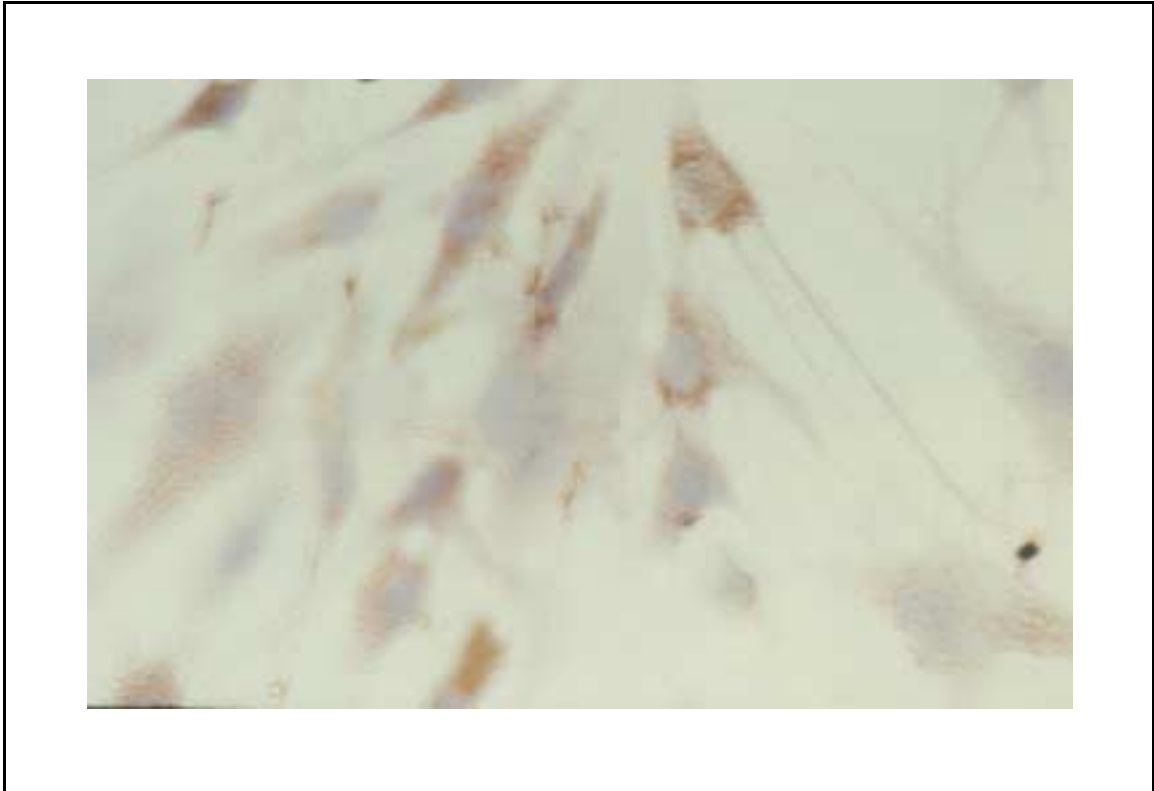


Abb. 33: Doppelfärbung mit anti-Kollagen I und II-AK, dedifferenzierte Chondrozyten, ELF-EMF-Einfluss, Vergrößerung x 400: nur Nachweis von fibroblastenspezifischem Kollagen-I (braun)

Die Kollagenproduktion wurde ebenfalls mit dem Sirius Red ELISA quantifiziert. Es zeigte sich hierbei eine hohe Korrelation der Werte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,948. Die Wertänderung betrug lediglich 2 % der Standardabweichung, so dass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Kollagenproduktion und ELF-EMF-Befeldung bei den dedifferenzierten Chondrozyten festgestellt werden kann (f-Wert: 1,04) (Abb. 34).

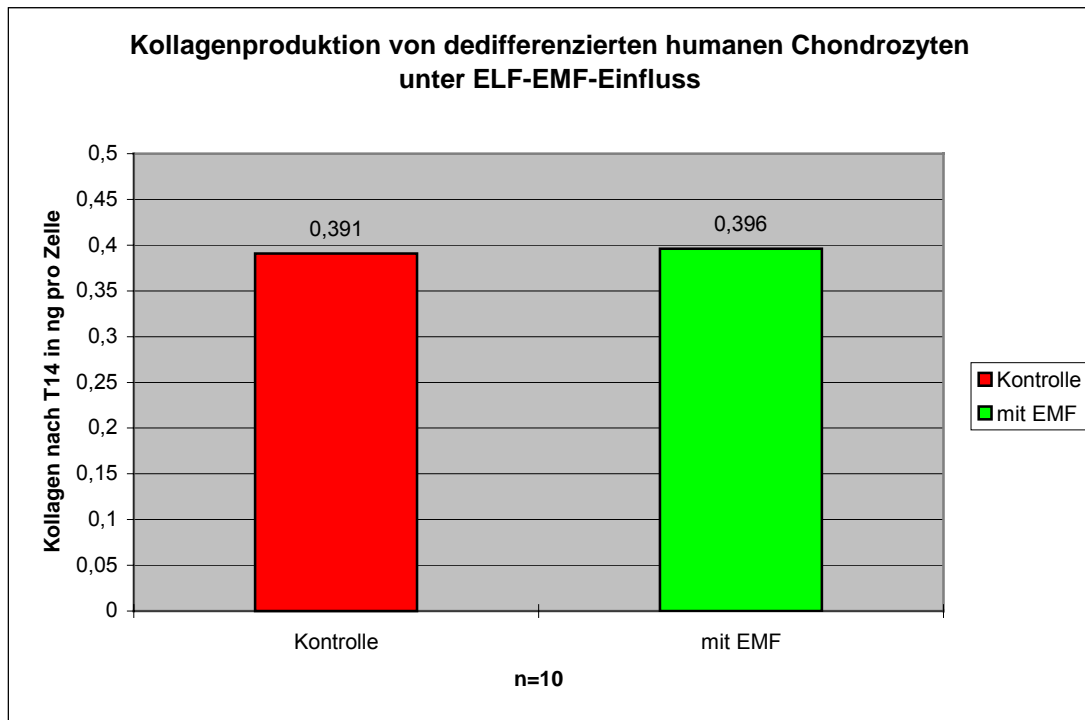


Abb. 34: Quantitative Analyse der Kollagensynthese bei dedifferenzierten Chondrozyten mittels Sirius Red ELISA: nahezu identische Werte ohne statistisch signifikanten Unterschied (Korrelationskoeff. 0,948, Δ -Werte = 2 % der Standardabweichung, f-Wert 1,04).

5.2.4.2. Untersuchung der Synthese von Chondroitin-6-phosphat

Wie bei den frisch isolierten Chondrozyten wurde auch bei den dedifferenzierten Zellen die Syntheseleistung des knorpelspezifischen Proteins Chondroitin-6-phosphat untersucht. Wie beim Kollagen II wird auch beim Chondroitin-6-phosphat die Produktion während der Amplifizierungs- und Dedifferenzierungsphase eingestellt. Auch hier zeigte sich, dass es unter dem Einfluss des elektromagnetischen Feldes zu keiner neuen Expression von Chondroitin-6-phosphat kam (Abb. 35, 36).

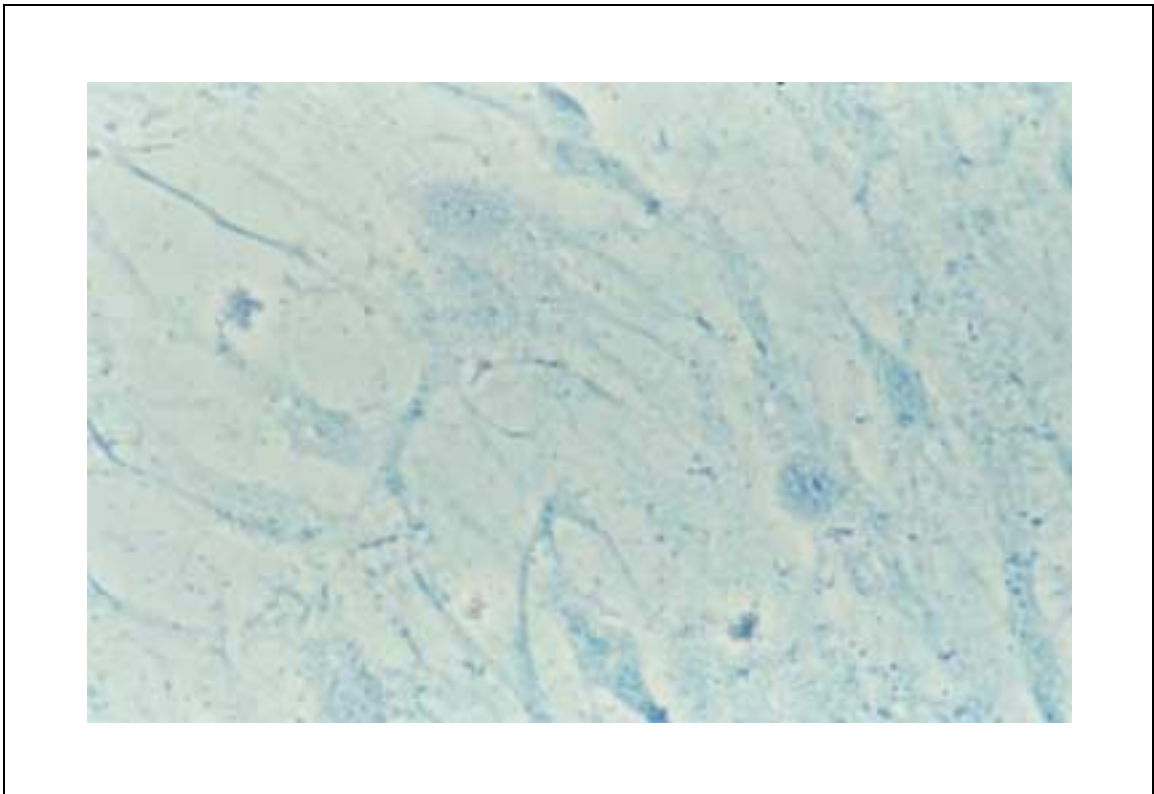


Abb. 35: Fehlender Nachweis von Chondroitin-6-phosphat bei dedifferenzierten Chondrozyten der Kontrollgruppe, Vergrößerung x 200

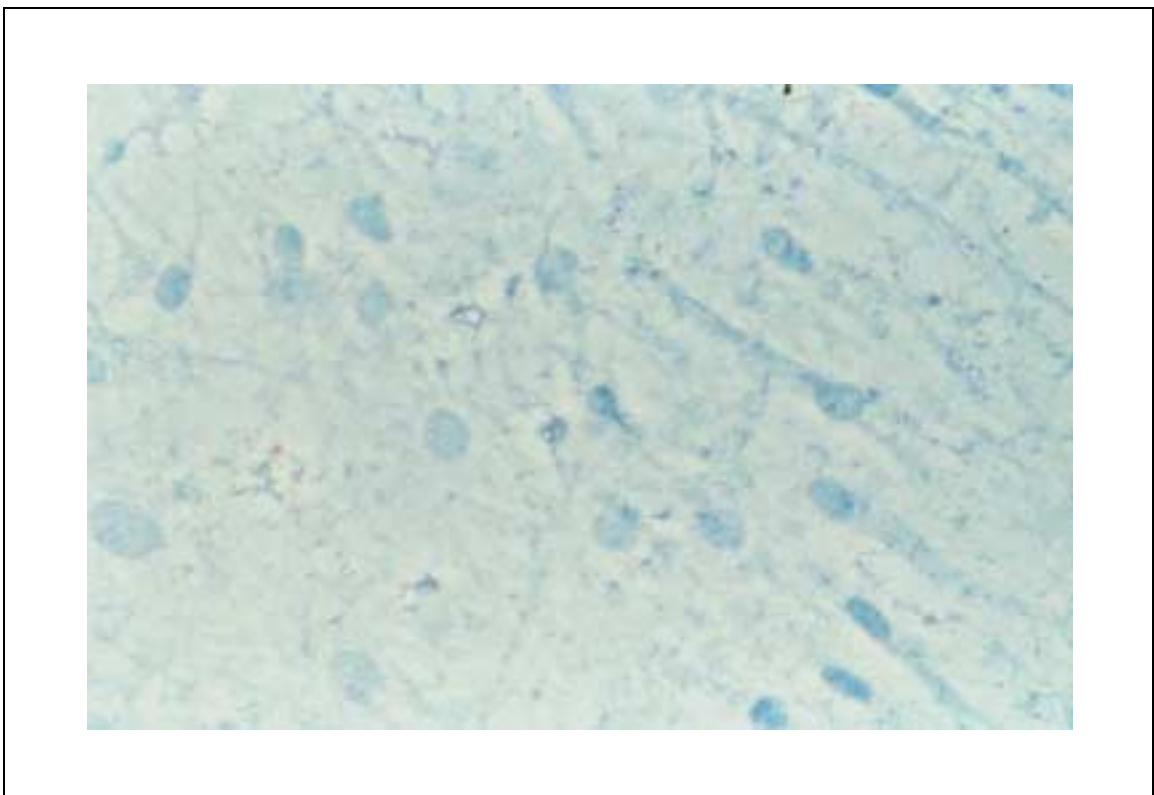


Abb. 36: Fehlender Nachweis von Chondroitin-6-phosphat bei dedifferenzierten, unter ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten, Vergrößerung x 200

5.2.4.3. Untersuchung der Oberflächenantigene

Bei den von den Knorpelzellen exprimierten Oberflächenantigenen handelt es sich im Gegensatz zu den Matrixproteinen um konstante Syntheseprodukte, die von kultivierten Chondrozyten auch nach einer langen Amplifizierungsphase und der damit verbundenen vollständigen Dedifferenzierung gebildet werden. So konnte ICAM I auch bei den entdifferenzierten Zellen sowohl in der Kontroll- als auch in der ELF-EMF-befeldeten Kultur nachgewiesen werden (Abb. 37, 38). Auch die nicht nachweisbare Expression von HLA Klasse II-Antigenen konnte in beiden Gruppen bestätigt werden (Abb. 39, 40).

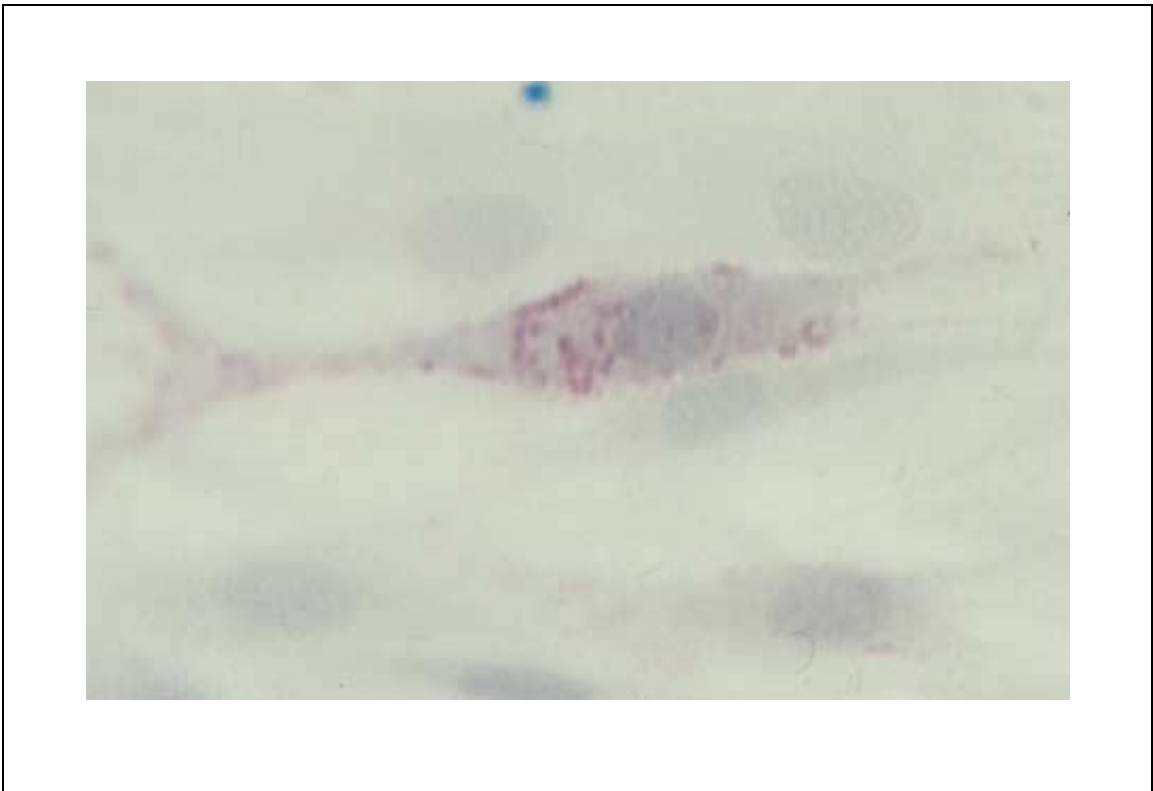


Abb. 37: Nachweis von ICAM I (rot) bei dedifferenzierten Chondrozyten der Kontrollgruppe, Vergrößerung x 400

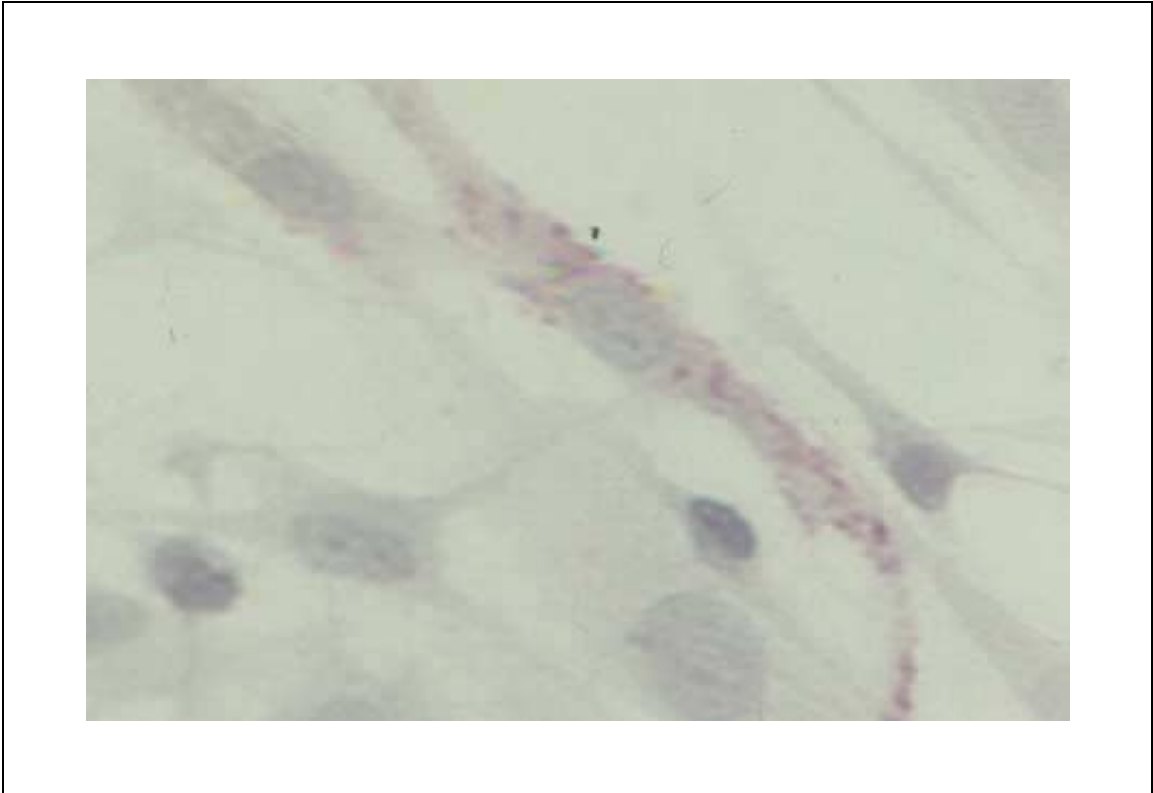


Abb. 20: Nachweis von ICAM I (rot) bei dedifferenzierten, unter ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten, Vergrößerung x 400

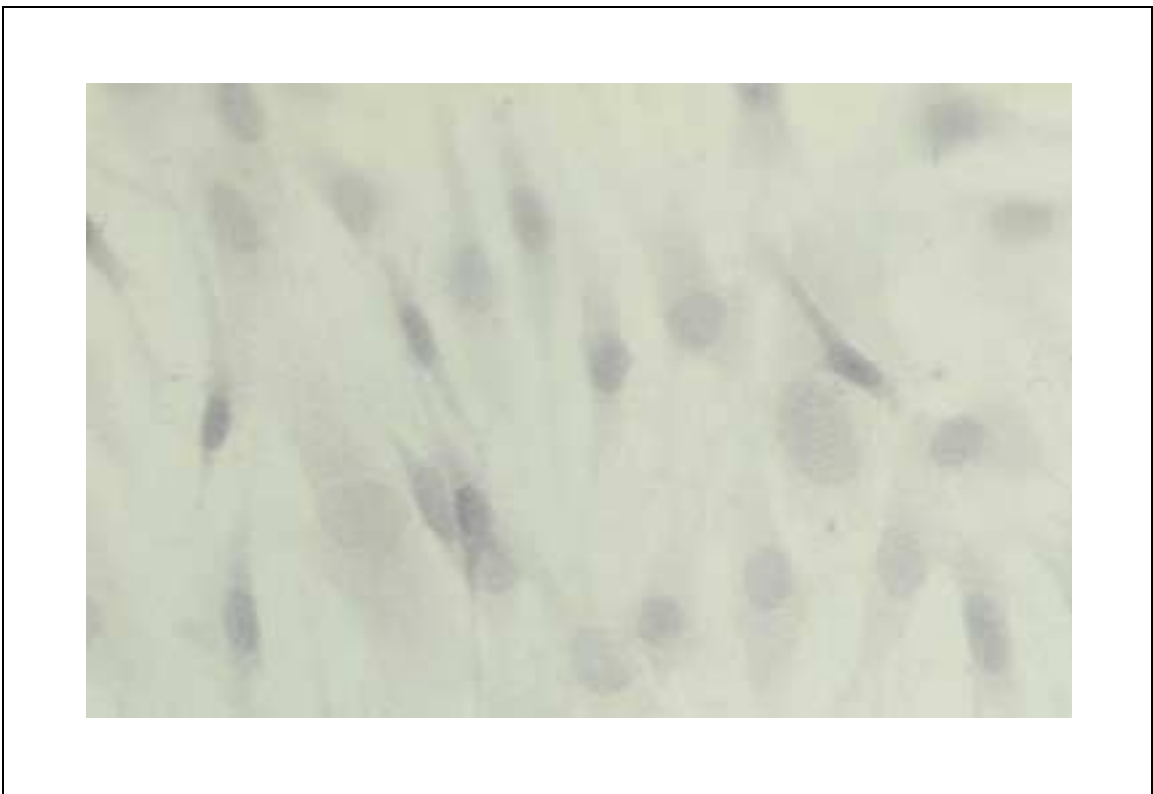


Abb. 39: Fehlender Nachweis von HLA II bei dedifferenzierten Chondrozyten der Kontrollgruppe, Vergrößerung x 200

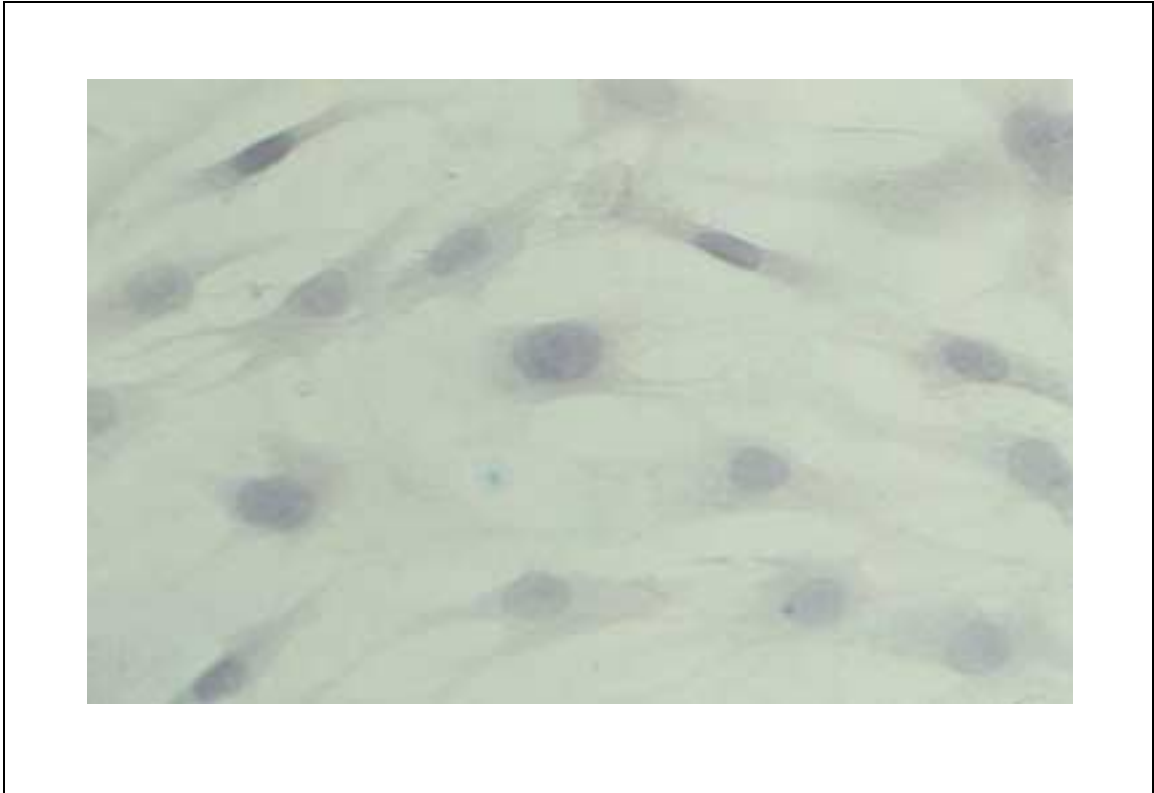


Abb. 24: Fehlender Nachweis von HLA II bei dedifferenzierten, unter ELF-EMF-Einfluss kultivierten Chondrozyten, Vergrößerung x 200

6. Diskussion

6.1. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf das Proliferationsverhalten frisch isolierter und dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur

Es konnte gezeigt werden, dass ausdifferenzierte Knorpelzellen, die in intaktem Knorpelgewebe erwachsener Individuen keine mitotische Aktivität mehr besitzen [49], in vitro nach Isolation aus dem Gewebeverbund [64,161] oder in vivo bei Vorliegen pathologischer Prozesse [50,150] ihre Proliferationsfähigkeit wiedererlangen.

Die Amplifikation von Chondrozyten in der Monolayerkultur stellt eine gängige Zellkulturmethode dar. Sie ist einer der entscheidenden Schritte beim Tissue Engineering von Knorpelgewebe.

Auf diese Weise ist die Herstellung großer Mengen humaner Chondrozyten in vitro möglich [162]. Hierbei kann eine Vermehrung um den Faktor 1.000 bis 100.000 erreicht werden [22], ohne dass eine Abhängigkeit der Vermehrungsrate vom Alter und Geschlecht des Patienten nachgewiesen wurde [17,22,158].

Die Zellteilungsrate der Chondrozyten wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Entfernung der interzellulären Matrix löst die sterische Behinderung der Zellteilung [161], so dass eine erhöhte DNA-Syntheserate nachgewiesen werden kann [102]. Daneben lässt sich das Proliferationsverhalten durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren in das Kulturmedium positiv beeinflussen. Für humane Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass verschiedene Wachstumsfaktoren wie b-FGF, TGF- β und EGF einen Proliferationsstimulus darstellen [27,116,139]. Dieser Effekt wird durch die Kombination mit FCS verstärkt [23]. Für den klinisch relevanten Einsatz der Transplantate sollte jedoch statt des FCS autologes Humanserum verwendet werden, das die Proliferationsgeschwindigkeit nochmals steigert und die Gefahr einer Infektion mit Prionen vermindert [66].

In der Literatur werden unterschiedliche Effekte von elektromagnetischen Feldern auf das Proliferationsverhalten verschiedener Zellen beschrieben. Insbesondere der Einfluss auf Lymphozyten und periphere Blutzellen war Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl zu einer Steigerung der Zellteilung [5] als auch zu einem starken Anstieg der DNA-Syntheseleistung kommt [35]. Ein wichtiger Faktor scheint hierbei die durch das EMF gesteigerte Produktion von Cytokinen und Interleukinen zu sein [85,104].

Für das Tissue Engineering von Knorpel- und Knochengewebe von größerer Relevanz ist der Effekt von elektromagnetischen Feldern auf das Proliferationsverhalten mesenchymaler Zellen. Hierzu finden sich in der Literatur sich in Abhängigkeit von Art und Intensität des elektromagnetischen Feldes Berichte über unterschiedlichste Reaktionen der behandelten Zellen. So konnte für Fibroblasten und Osteoblasten in der Zellkultur eine Proliferationssteigerung anhand einer erhöhten DNA Synthese nachgewiesen werden [42,43,68,104,117]. Andere Autoren beschreiben im Gegensatz dazu eine Proliferationsminderung zum Teil zugunsten eines mehr oder weniger ausgeprägten Differenzierungsverhaltens [123,126,149] oder als direkte Einwirkung der ELF-EMF auf ein vermindertes Attachment in der Zellkultur und eine Initialisierung der Apoptose [14]. Andere Autoren konnten hingegen keinerlei Effekte des elektromagnetischen Feldes auf das Proliferationsverhalten dieser Zellarten feststellen [6,98,117].

Auch bei Chondrozyten wird der Effekt von elektromagnetischen Feldern auf das Proliferationsverhalten kontrovers diskutiert. So beschrieben Elliott und Mitarbeiter 1988 eine verringerte Proliferation boviner Gelenkknorpelzellen bei Kultivierung in einer vertikalen Helmholtz-Spule mit 3 % FCS als Medienzusatz, wohingegen bei Zusatz von 5 % FCS und Kultivierung in einer horizontalen Spule kein Effekt nachweisbar war [53]. Von einigen Autoren werden hingegen deutliche Proliferationssteigerungen unter Einfluss von ELF-EMF beschrieben [128,148,153], wobei vermutet wird, dass die Proliferationssteigerung über eine ELF-EMF-abhängige Erhöhung der cAMP Produktion vermittelt wird [18]. Andere betrachten das Verhalten differenzierter. De Mattei und Mitarbeiter stellten 2001 einen Zusammenhang zwischen der Reagibilität auf ELF-EMF und der

Dichte der Zellkultur her: Wurden die Chondrozyten mit geringer Dichte ausgesät, zeigte sich ein lang anhaltender Proliferationsstimulus durch das elektromagnetische Feld. Bei Kultivierung mit einer hohen Zellzahl pro Flächeneinheit konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden [42]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass der durch die Behandlung mit ELF-EMF ausgelöste Effekt stark vom Vorhandensein von FCS und anderer Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium ist [135].

In der vorliegenden Arbeit wurden frisch isolierte Chondrozyten und langzeitkultivierte dedifferenzierte Chondrozyten verwendet. Diese Zellen zeigten unter ELF-EMF-Einfluss verschiedene Proliferationstendenzen. Bei den frisch isolierten Knorpelzellen kam es nach sieben Tagen im Magnetfeld zu einer leicht reduzierten Proliferation im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Diese Tendenz schlug sich sowohl bei den absoluten Zellzahlen nieder als auch bei der DNA-Synthese, die mittels BrdU-ELISA ermittelt wurde. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine statistische Signifikanz. Bei einer ebenfalls horizontalen Spulenausrichtung im verwendeten Versuchsaufbau kann hier eine Parallele zu den Ergebnissen von Elliott und Mitarbeitern 1988 [53] gezogen werden.

Anders verhielten sich langzeitkultivierten dedifferenzierten Chondrozyten. Hier kam es zu einer leichten Steigerung der Proliferation unter ELF-EMF-Einfluss, die sich auch bei der Zellzahlbestimmung und der BrdU-Inkorporation nachweisen ließ, allerdings waren auch diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Da die dedifferenzierten Knorpelzellen phänotypisch den Fibroblasten sehr ähnlich sind, finden sich vergleichbare Ergebnisse in den Arbeiten von Archer und Razcliffe 1983 sowie McDonald 1993 [6,117]. Die Proliferation in der für das Tissue Engineering sehr wichtigen Amplifizierungsphase lässt sich somit nicht, oder nur in sehr geringem Masse, durch die Kultivierung der Zellen im Magnetfeld beeinflussen. Es erscheint daher nicht sinnvoll, dieses Verfahren standardmäßig in der 2D-Monolayerkultur bei der Herstellung autologer Transplantate für Knorpeldefekte anzuwenden.

6.2. Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Synthese knorpel-spezifischer Proteine frisch isolierter und dedifferenzierter Chondrozyten in der Monolayerkultur

Von immenser klinischer Relevanz ist neben der Proliferation das Dedifferenzierungs- bzw. Redifferenzierungsverhalten kultivierter Zellen. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl durch Amplifizierung in der 2D-Monolayerkultur werden die dedifferenzierten Zellen beim Tissue Engineering von Knorpelgewebe in ein 3D-Kulturmodell überführt, in dem eine Redifferenzierung der Zellen mit Bildung der gewebespezifischen Proteine stattfinden soll.

Derzeit existieren unterschiedlichste Ansätze, um dieses Redifferenzierungsverhalten auszulösen. Einerseits wird versucht, den Zellen über das Trägermaterial der 3D-Kultur einen Stimulus zur Matrixsynthese zu geben. Es werden Materialien verwandt, die der Knorpelgrundsubstanz ähnlich sind. So kommen Polyglykolate [89,116], Polylactide [151] sowie Copolymere [151], aber auch Trägermaterialien auf Hyaluronsäurebasis [4] zum Einsatz. Ein weiteres Prinzip besteht in der Verwendung undifferenzierter Zellen wie humaner mesenchymaler Stammzellen, die im 3D-Zellträgerkonstrukt unter Einfluss von Wachstumsfaktoren zu Chondrozyten differenzieren sollen [124,130,147]. Ein anderer Ansatz besteht in der Entwicklung sogenannter Bioreaktoren, die entweder einen kontinuierlichen Nährmediumfluss und somit gleichbleibende Nährstoffkonzentrationen gewährleisten sollen [30,159] oder die in vitro eine physiologisch-physikalische Belastungssituation simulieren sollen, die dann als Differenzierungsstimulus wirkt [44]. Diese Methoden beschränken sich weitgehend auf den Einsatz bei 3D-Gewebekulturen. Die Beeinflussung der Proteinsynthese der in der 2D-Monolayerkultur kultivierten Zellen geschieht derzeit in erster Linie durch Wachstumsfaktoren [23,27,29].

Eine weitere Beeinflussungsmöglichkeit besteht in der Simulation eines mechanischen Reizes durch die Applikation elektromagnetischer Felder. So konnte für Zellen mesenchymaler Herkunft wie Fibroblasten und Osteoblasten gezeigt werden, dass es unter ELF-EMF-Einfluss zu einer gesteigerten Synthese von Matrixproteinen kommen kann, die mit einer Zelldifferenzierung verbunden ist

[47,149]. Als Ursache hierfür werden unterschiedliche Signaltransduktionsmechanismen diskutiert. Zum einen ließ sich eine Stimulation der Proteinkinase A nachweisen, die die terminale Differenzierung kultivierter humaner Hautfibroblasten induziert [113]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass es unter ELF-EMF-Einfluss zu einer vermehrten Bildung von Bone Morphogenetic Proteins durch die behandelten Zellen kommt, welche dann wiederum die Synthese von Matrixproteinen stimulieren [15170].

Bei Chondrozyten werden zum Teil ähnliche Effekte beschrieben. So haben neuste Studien ergeben, dass es unter ELF-EMF-Einfluss zu einer vermehrten Expression von Proteoglycan sowie Kollagen II mRNA gekommen ist, die eine erhöhte Proteinbiosynthese bedingte [37]. An anderer Stelle wird von einer deutlich reduzierten Proteinbiosynthese zugunsten einer gesteigerten Proliferation berichtet [127]. Bei Kultivierung von Knorpelxplantaten im elektromagnetischen Feld fand sich ein erniedrigter Umsatz an Proteoglykanen, ohne dass es zu Veränderungen an der Proteinstruktur kam [107,108].

In dieser Arbeit wurden als Marker für die knorpelspezifische extrazelluläre Matrix Kollagen II und Chondroitin-6-phosphat analysiert. In den immunhistochemischen Färbungen zeigten sich weder bei den frisch isolierten noch bei den langzeitkultivierten dedifferenzierten Chondrozyten durch die Befeldung mit ELF-EMF hervorgerufene Veränderungen in der Syntheseleistung der Matrixproteine. Auch die quantitative Analyse mit einem Kollagen-ELISA zeigte keinen signifikanten Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Kollagenproduktion. In der Literatur sind vergleichbare Ergebnisse beschrieben, bei denen kein Effekt von ELF-EMF auf die Synthese von Matrixproteinen festgestellt werden konnte [53,153].

Neben den Matrixproteinen ist auch die Synthese von Oberflächenantigenen von maßgeblicher Bedeutung für das Tissue Engineering. So werden das Intercellular-adhesion-molecule I (ICAM I / CD 54) und die humanen Leukozyten Antigene der Klasse II (HLA II) mit Entzündungsreaktionen im Knorpelgewebe in Verbindung gebracht, die durch die zelluläre Immunabwehr vermittelt werden

[32,100,157] und kann somit auch zur Abstoßung eines autologen Knorpeltransplantates führen [136].

Das ICAM I wird im gesunden Knorpelgewebe nicht exprimiert. Es kann jedoch bei kultivierten Chondrozyten einige Stunden nach der Isolation aus dem Gewebeverband vereinzelt nachgewiesen werden [41]. In den durchgeführten Versuchen mit frisch isolierten und dedifferenzierten Chondrozyten war ICAM I in vereinzelt Zellen nachweisbar. Ein Effekt des elektromagnetischen Feldes war nicht erkennbar. In der Literatur findet sich nur ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen ICAM I und dem Einfluss eines magnetischen Feldes. Bondemark und Mitarbeiter konnten 1998 ICAM I und HLA Klasse II Antigene in der oralen Mukosa nahe von intraoralen kieferorthopädischen Magneten nachweisen. Allerdings zeigten sich derartige Veränderung an der Oberfläche von Schleimhautzellen auch in räumlicher Nähe von nicht-magnetischen kieferorthopädischen Vorrichtungen, so dass hier der Schluss nahe liegt, dass es sich nicht um eine ELF-EMF-induzierte Veränderung handelt, sondern um eine Kontaktirritation durch Mikrotraumen [16].

Im Gegensatz zu den ICAM I Oberflächenantigenen werden die HLA II Antigene nicht von isolierten Chondrozyten gebildet. Zu Ihrer Expression ist eine Stimulation der Zellen mit Interleukinen (IL) oder Gamma-Interferon (γ -IFN) erforderlich [24]. Der Effekt von ELF-EMF auf die Expression von HLA Antigenen wurde von Conti und Mitarbeitern 1999 an verschiedenen Zellarten, jedoch nicht an Knorpelzellen untersucht. Es zeigte sich, dass ELF-EMF zu einer gesteigerten Expression von HLA Klasse I, jedoch nicht von HLA Klasse II Antigenen führt [38]. Diese Ergebnisse sind mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit vereinbar, da sich weder bei den frisch isolierten noch bei den dedifferenzierten Chondrozyten HLA Klasse II Antigene nachweisen ließen.

Aus der Summe der Ergebnisse lässt sich die Erkenntnis ableiten, dass die Behandlung kultivierter Chondrozyten mit elektromagnetischen Feldern in der 2D-Monolayerkultur weder positive noch negative Einflüsse auf die Knorpelzellen ausübt. Das Dedifferenzierungsverhalten wird weder verstärkt noch vermindert. Eine Kultivierung der Zellen im Magnetfeld scheint daher nicht sinnvoll. Es ist

jedoch zu überprüfen, ob der Einfluss von ELF-EMF auf Zellen in der 3D-Kultur einen positiven Effekt auf die Ausbildung einer knorpelspezifischen Interzellularsubstanz hat.

7. Zusammenfassung

Der Einsatz von autologen Knorpel- und Knochentransplantaten ist immer noch das Verfahren der Wahl zur Defektdeckung im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. In den letzten Jahren hat die künstliche Herstellung solcher Implantate mittels Tissue Engineering-Verfahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Da aber diese Methoden der Gewebeherstellung noch nicht ausgereift sind, besteht ein erheblicher Bedarf an der Entwicklung neuer Verfahrenstechniken in diesem Bereich. In der Literatur wurde vielfach ein positiver Effekt von elektromagnetischen Feldern auf die Knochenheilung in vivo beschrieben, bei der es über eine beschleunigte enchondrale Ossifikation zu einer Stimulation der Bildung von Knochenkallus kam. Die Erprobung der Kultivierung von Knorpelzellen in einem elektromagnetischen Feld erschien daher als Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit sinnvoll.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die Einflüsse von elektromagnetischen Feldern auf die Vitalität, das Proliferationsverhalten, die Synthese von knorpelspezifischen Matrixproteinen und die Expression chondrozyten-spezifischer Oberflächenantigene bei Chondrozyten in der 2D-Monolayerkultur analysiert. Hierzu wurden je 10 Zellkulturen aus frisch isolierten Knorpelzellen und dedifferenzierten langzeitkultivierten, fibroblastenartigen Chondrozyten etabliert, die dann in eine Kontrollkultur und eine Kultur zur Befeldung mit ELF-EMF geteilt wurden. Zur Bestimmung von Vitalität und Proliferationsverhalten kamen qualitative und quantitative Verfahren zum Einsatz. So wurde mittels Anfärbung mit Trypanblau bei allen Kulturen an mehreren Tagen im Verlauf der Kultivierungszeit die Vitalität und die absolute Zellzahl bestimmt. Außerdem erfolgte bei allen Zellkulturen eine Untersuchung der DNA-Syntheseleistung mittels BrdU-ELISA. Es folgten immunhistochemische Proliferationsnachweise mit den Markern Ki-67 und BrdU.

Zur Untersuchung der Synthese von Matrixproteinen wurde bei allen Kulturen der Kollagengehalt im Kulturmedienüberstand mit dem SIRIUS RED Kollagen-Assay gemessen. Immunhistochemische Färbungen mit der APAAP- und der

PAP- Methode auf Antikörper gegen Kollagen I, Kollagen II und Chondroitin-6-phosphat wurden ebenfalls durchgeführt.

Des weiteren erfolgte, ebenfalls mit der immunhistochemischen APAAP- Färbemethode, die Detektion der spezifischen Oberflächenproteine ICAM I und Antigenen der HLA Klasse II.

Es konnte festgestellt werden, dass ELF-EMF keinen Einfluss auf Vitalität und Proliferation der frisch isolierten und der dedifferenzierten Chondrozyten hatte. Auch die Synthese von Matrixproteinen wurde nicht durch die Behandlung mit dem Magnetfeld beeinflusst. Genauso wenig kam es bei der Expression der Oberflächenantigene ICAM I und HLA II zu nachweisbaren Veränderungen durch das ELF-EMF.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte also nachgewiesen werden, dass die Kultivierung der Chondrozyten in der 2D-Monolayerkultur unter ELF-EMF-Einfluss zum Zweck des Tissue Engineering keine Vorteile erbringt und somit nicht sinnvoll ist.

Die Entwicklung immer neuer Techniken auf dem Gebiet der dreidimensionalen Zellkultivierung ist Gegenstand aktueller Forschungen. Trotz der hier gefundenen negativen Ergebnisse in der zweidimensionalen Monolayerkultur sollte der Effekt von ELF-EMF auf die 3D-Knorpelzellkultur noch genauer untersucht werden, da das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Chondrozyten im dreidimensionalen Kulturmodell eine größere Ähnlichkeit zum Verhalten von Knorpelgewebe in vivo aufweisen. Im Tiermodell konnte ja bereits ein positiver Effekt von Magnetfeldern auf das Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Einen zusätzlichen Ansatzpunkt für weitere Forschungen könnte die Untersuchung von ELF-EMF Einflüssen auf kultivierte Chondrozyten bei gleichzeitiger Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren darstellen.

8. Literaturverzeichnis

1. **Abbott J, Holtzer H**
The loss of phenotypic traits by differentiated cells, 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures.
J Cell Biol 28 (1966) 473-487
2. **Adey WR**
Biological effects of electromagnetic fields.
J Cell Biochem 51 (1993) 410-416
3. **Ahlbom IC, Cardis E, Green A, Linet M, Savitz D, Swerdlow A**
Review of the epidemiologic literature on EMF and Health.
Environ Health Perspect 109 Suppl 6 (2001) 911-933
4. **Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A**
Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester.
J Biomed Mater Res 42 (1998) 172-181
5. **Antonopoulos A, Yang B, Stamm A, Heller WD, Obe G**
Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro.
Mutat Res 346 (1995) 151-157
6. **Archer CW, Ratcliffe NA**
The effects of pulsed magnetic fields on chick embryo cartilaginous skeletal rudiments in vitro.
J Exp Zool 225 (1983) 243-256
7. **Aulthouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA**
Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro.
In Vitro Cell Dev Biol 25 (1989) 659-668
8. **Aydelotte MB, Kuettner KE**
Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production.
Connect Tissue Res 18 (1988) 205-222
9. **Bassleer C, Gysen P, Bassleer R, Franchimont P**
Proteoglycans synthesized by human chondrocytes cultivated in clusters.
Am J Med Nov 83(1987) 25-28
10. **Benya PD, Brown PD**
Modulation of the chondrocyte phenotype in vitro.
In: "Articular Cartilage Biochemistry", Kuettner K (ed.), Raven Press, New York (1986) 219-233.

11. **Benya PD, Padilla SR, Nimni ME**
Independent Regulation of Collagen Types of Chondrocytes During the Loss of Differentiated Function in Cell Culture.
Cell 15 (1978) 1313-1321
12. **Benya PD, Shaffer JD**
Dedifferentiated Chondrocytes Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype when Cultured in Agarose Gels.
Cell 30 (1982) 215-224
13. **Berghaus A, Toplak F**
Surgical concepts for reconstruction of the auricle.
Otolaryngol Head Neck Surg 112 (1986) 388-397
14. **Blumenthal NC, Ricci J, Breger L, Zychlinsky A, Solomon H, Chen GG, Kuznetsov D, Dorfman R**
Effects of low-intensity AC and/or DC electromagnetic fields on cell attachment and induction of apoptosis.
Bioelectromagnetics 18 (1997) 264-272
15. **Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, Winrow VR, Kanczler JM, Simon B, Abbott J, Blake DR, Stevens CR**
Pulsed Electromagnetic Fields Simultaneously Induce Osteogenesis and Upregulate Transcription of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Rat Osteoblasts in vitro.
Biochem Biophys Res Comm 250 (1998) 458-461
16. **Bondemark L, Kurol J, Larsson A**
Long-term effects of orthodontic magnets on human buccal mucosa--a clinical, histological and immunohistochemical study.
Eur J Orthod 20 (1998) 211-218
17. **Bräunling J**
Tissue Engineering von Knorpelgewebe: Untersuchungen zur in vitro Chondrozytenvermehrung.
Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation (1997) 25-31
18. **Brighton CT, Townsend PF**
Increased cAMP Production After Short-Term Capacitively Coupled Stimulation in Bovine Growth Plate Chondrocytes.
J Orthop Res 6 (1988) 552-558
19. **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 33 (1994) 889-895
20. **Brown CS, Ling FW, Wan JY, Pilla AA**
Efficacy of static magnetic field therapy in chronic pelvic pain: a double-blind pilot study.
Am J Obstet Gynecol 187 (2002) 1581-1587

21. **Brunner FX**
Implantatmaterialien – was hat sich wo und wann bewährt?
Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl (1993) 311-336
22. **Bujía J**
Culturing autologous cartilage tissue for reconstructive surgery:
possibilities and limits.
Laryngorhinootologie 74(1995) 205-210
23. **Bujía J**
Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Zellproliferation und Matrixsyn-
these von kultivierten menschlichen Chondrozyten.
Laryngorhinootologie 74 (1995) 444-449
24. **Bujía J, Alsalameh S, Sittinger M, Hammer C, Wilmes E,
Burmester G**
Antigen presenting cell function of class II positive human nasal
chondrocytes.
Acta Otolaryngol Jan 114 (1994) 75-79
25. **Bujía J, Meyer H, Hammer C, Wilmes E, Gürtler L**
Human immunodeficiency virus cannot productively infect freshly
cultured human cartilage cells.
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 55 (1993) 222-225
26. **Bujía J, Osete JM, Sprekelsen C, Wilmes E**
Vitale Konservierung von Knorpeltransplantaten mittels Gewebekul-
turmethode.
Laryngorhinootologie 73 (1994) 249-252
27. **Bujía J, Pitzke P, Wilmes E, Hammer C**
Culture and Cryopreservation of Chondrocytes from Human Cartilage
Relevance for Cartilage Allografting in Otolaryngology.
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 54 (1992) 80-84
28. **Bujía J, Pitzke P, Kastenbauer E, Wilmes E, Hammer C**
Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal
chondrocytes cultured in monolayer and in agar.
Eur Arch Otorhinolaryngol 253 (1996) 336-340
29. **Bujía J, Sittinger M, Hammer C, Burmester G**
Effect of Growth Factors on Cell Proliferation by Human Nasal Septal
Chondrocytes Cultured in Monolayer.
Acta Otolaryngol 114 (1994) 539-543
30. **Bujía J, Sittinger M, Minuth WW, Hammer C, Burmester G,
Kastenbauer E**
Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces
and perfusion culture.
Acta Otolaryngol 115 (1995) 307-310

31. **Bujía 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
32. **Bujía J, Wilmes E, Allmeling AM, Krombach F, Hammer C**
Detection of Transplantation Antigens on Human Cartilage: Role of Class II Antigens in the Immunological Behaviour of Allogenic Cartilage Transplants.
Otolaryngol Head Neck Surg (1990) 2875-2878
33. **Bujía J, Wilmes E, Hammer C**
Immunologisches Verhalten menschlicher Trachealtransplantate.
Laryngorhinootologie 71 (1992) 353-358
34. **Bujía J, Zietz C, Penning R, Wilmes E, Gürtler L**
Absence of HIV-1 DNA in cartilage from HIV-positive patients.
Eur Arch Otorhinolaryngo 251 (1994) 347-349
35. **Cadossi R, Bersani F, Cossarizza A, Zucchini P, Emilia G, Torelli G, Franceschi C**
Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields.
FASEB J 6 (1992) 2667-2674
36. **Capasso O, Gionti E, Pontarelli G, Ambesi-Impiombato FS, Nitsch L, Tajana G, Cancedda R**
The culture of chick embryo chondrocytes and the control of their differentiated functions in vitro. I. Characterization of the chondrocyte-specific phenotypes.
Exp Cell Res 142 (1982) 197-206.
37. **Chiombor DM, Lester G, Aaron RK, Neame P, Catterson B**
Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins.
J Orthop Res 20 (2002) 40-50
38. **Conti P, Reale M, Grilli A, Barbacane RC, Di Luzio S, Di Gioacchino M, De Lutiis MA, Felaco M**
Effect of electromagnetic fields on several CD markers and transcription and expression of CD4.
Immunobiology 201 (1999) 36-48
39. **Cordell JL, Fallini B, Erber WN**
Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes.
J Histochem Cytochem 32 (1984) 219-229
40. **Darendeliler MA, Darendeliler A, Sinclair PM**
Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing.
Int J Adult Orthodon Orthognath Surg 12 (1997) 43-53

- 41. Davies ME, Dingle JT, Pigott R, Power C, Sharma H**
Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on human articular cartilage chondrocytes.
Connect Tissue Res 26 (1991) 207-216
- 42. De Mattei M, Caruso A, Pezzetti F, Pellati A, Stabellini G, Sollazzo V, Traina GC**
Effects of pulsed electromagnetic fields on human articular chondrocyte proliferation.
Connect Tissue Res 42 (2001) 269-279
- 43. De Mattei M, Caruso A, Traina GC, Pezzetti F, Baroni T Sollazzo V**
Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro.
Bioelectromagnetics 20 (1999) 177-182
- 44. Demartean O, Jakob M, Schafer D, Heberer M, Martin I**
Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage.
Biorheology 40 (2003) 331-336
- 45. Deshmukh K, Kline WG**
Charakterisation of Collagen and Ist Precursors Synthesized by Rabbit-Articular-Cartilage Cells in Various Culture Systems.
Eur J Biochem 69 (1976) 117-123
- 46. Dickson WA, Inglis TJ**
Cialit preserved cartilage: failure to guarantee sterility.
Br J Plast Surg 41 (1988) 408-409
- 47. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G**
Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of osteoblasts.
Bioelectromagnetics 23 (2002) 398-405
- 48. Dominice J**
Age-Related Changes in Rabbit Articular Chondrocytes.
Mech Aging Dev 37 (1986-1987) 231-240
- 49. Dustmann HO, Puhl W, Krempien B**
Cell-division in articular cartilage. Experimental research in animals.
Arch Orthop Unfallchir 79 (1974) 171-182
- 50. Dustmann HO, Puhl W, Krempien B**
Phenomenon of clusters in arthrotic articular cartilage.
Arch Orthop Unfallchir 79 (1974) 321-333
- 51. Eichwald C, Kaiser F**
Model for external influences on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium oscillations.
Bioelectromagnetics 16 (1995) 75-85

- 52. Eichwald C, Walleczek J**
Model for magnetic field effects on radical pair recombination in enzyme kinetics.
Biophys J Aug 71 (1996) 623-631
- 53. Elliott JP, Smith RL, Block CA**
Time- Varying Magnetic Fields: Effects of Orientation on Chondrozyte Proliferation.
J Orthop Res 6 (1988) 259-264
- 54. Eviatar A, Myssiorek D**
Repair of nasal septal perforations with tragal cartilage and perichondrium grafts.
Otolaryngol Head Neck Surg 100 (1989) 300-302
- 55. Feychting M, Ahlbom A**
Childhood leukemia and residential exposure to weak extremely low frequency magnetic fields.
Environ Health Perspect 103 Suppl 2 (1995) 59-62
- 56. Floderus B, Persson T, Stenlund C, Wennberg A, Ost A, Knave B**
Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukemia and brain tumors: a case-control study in Sweden.
Cancer Causes Control. 4 (1993) 465-476
- 57. Fredericks DC, Nepola JV, Baker JT, Abbott J, Simon B**
Effects of pulsed electromagnetic fields on bone healing in a rabbit tibial osteotomy model.
J Orthop Trauma 14(2000) 93-100
- 58. Freshney RI**
Primary Culture.
In: "Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique", Freshney RI, John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th ed. (2000) 149-157
- 59. Freshney RI**
Primary Culture.
In: "Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique", Freshney RI, John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th ed. (2000) 9-16
- 60. Gellrich NC, Schimming R, Schramm A, Schmalohr D, Bremerich A, Kugler J**
Pain, function, and psychologic outcome before, during, and after intraoral tumor resection.
J Oral Maxillofac Surg 60 (2002) 772-777
- 61. Glaser R**
"Elektrosmog" – Ein Gebiet zwischen Wissenschaft und Polemik.
In: „Gesundheitsrisiken elektromagnetischer Felder“, Marburger P, Reinhardt M, Schröder M (eds.), Erich Schmidt Verlag Berlin (1998) 47-62

- 62. Goodman R, Blank M**
Insights into electromagnetic interaction mechanisms.
J Cell Physiol 192 (2002) 16-22
- 63. Graham BS, Thiringer JK, Barret TL**
Nasal tip ulceration from infection and extrusion of a nasal alloplastic implant.
J Am Acad Dermatol 44 Suppl 2 (2001) 362-364
- 64. Green WT Jr**
Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting.
Clin Orthop 75 (1977) 237-250
- 65. Griebel J, Kellerer AM, Lengfelder E, Schmid E**
Grundlagen der Strahlenbiologie.
In: „Radiologie I“ Lissner J, Fink U, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 4. Auflage (1992), 31-50
- 66. Gruber R, Sittinger M, Bujía J**
In vitro cultivation of human chondrocytes using autologous human serum supplemented culture medium: minimizing possible risk of infection with pathogens of prion diseases.
Laryngorhinootologie 75 (1996) 105-108
- 67. Grundler W, Kaiser F, Keilmann F, Walleczek J**
Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems.
Naturwissenschaften 79 (1992) 551-559
- 68. Guzelsu N, Salkind AJ, Shen X, Patel U, Thaler S, Berg RA**
Effect of electromagnetic stimulation with different waveforms on cultured chick tendon fibroblasts.
Bioelectromagnetics 15 (1994) 115-131
- 69. Hakansson N, Floderus B, Gustavsson P, Johansen C, Olsen JH**
Cancer incidence and magnetic field exposure in industries using resistance welding in Sweden.
Occup Environ Med 59 (2002) 481-486
- 70. Hammer C, Bujía J**
Immunologie vitaler und konservierter Transplantate.
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. Suppl. 1 (1992) 3-26
- 71. Harkins TT, Grissom CB**
Magnetic field effects on B12 ethanolamine ammonia lyase: evidence for a radical mechanism.
Science 263 (1994) 958-960
- 72. Heermeier K, Spanner M, Träger J, Gradinger R, Strauss PG, Kraus W, Schmidt J**
Effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on collagen type I mRNA expression and extracellular matrix synthesis of

- human osteoblastic cells.
Bioelectromagnetics 19 (1998) 222-231
- 73. Heinegard D, Oldberg A**
Structure and Biology of Cartilage and Bone Matrix Noncollagenous Macromolecules.
FASEB J 3 (1989) 2042-2051
- 74. Hellmich S**
Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich.
HNO 30 (1982) 140-144
- 75. Henkel KO, Gerber T, Dorfling P, Hartel J, Jonas L, Gundlach KK, Bienengräber V**
Stimulating regeneration of bone defects by implantation of bioceramics and autologous osteoblast transplantation.
Mund Kiefer Gesichtschir 6 (2002) 59-65
- 76. Herberhold C**
Transplantation von Larynx und Trachea beim Menschen.
Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl 1 (1992) 247-255
- 77. Herzmann K, Grass R, Barthel S, Zwipp H**
Allogenic transplantation of femoral condyle after traumatic injury.
Unfallchirurg 105 (2002) 71-74
- 78. Herzog M, Sader R, Zeilhofer HF, Horch HH, Schonfeld B**
Functional and esthetic results after reconstruction of orbital walls.
Fortschr Kiefer Gesichtschir 39 (1994) 56-58
- 79. Horch HH, Steegmann B**
Experience with resorbable TCP-ceramic granules for the filling of large bone defects after cystectomy in the jaw.
Dtsch Zahnarztl Z 4 (1985) 672-677
- 80. Huizing EH, MacKay IS, Rettinger G**
Reconstruction of the nasal septum and dorsum by cartilage transplants-autogenic or allogenic? (clinical conference)
Rhinology 27 (1989) 5-10
- 81. Hüttenbrink K, Weidenfeller BP**
Sind Cialit-konservierte Ossikel als Mittelohrimplantate bakteriologisch noch vertretbar?
Laryng Rhinol Otol 69 (1995) 327-332
- 82. Ieran M, Zaffuto S, Bagnacani M, Annovi M, Moratti A, Cadossi R**
Effect of low frequency pulsing electromagnetic fields on skin ulcers of venous origin in humans: a double-blind study.
J Orthop Res 8 (1990) 276-282
- 83. Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao EY**
Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase

- osteotomy gap healing in a canine tibial model.
J Orthop Res 20 (2002) 1106-1114
- 84. Jaovisidha K, Hung J, Ning G, Ryan LM, Derfus BA**
Comparative calcification of native articular cartilage matrix vesicles and nitroprusside-generated vesicles.
Osteoarthritis Cartilage 10 (2002) 646-652
- 85. Jonai H, Villanueva MBG, Yasuda A**
Cytokine Profile of Human Peripheal Blood Mononuclear Cell Exposed to 50 Hz EMF.
Ind Health 34 (1996) 359-368
- 86. Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD**
Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes.
Nature 377 (1995) 438-441
- 87. Junqueira LC, Carneiro J**
Knorpel.
In: „Histologie“, Junqueira LC, Carneiro J, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage, (1991) 180-189
- 88. Juraha LZ**
Experience with alternative material for nasal augmentation.
Aesthetic Plast Surg 16 (1992) 133-140
- 89. Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, Hollander AP**
Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes.
Tissue Eng 8 (2002) 817-826
- 90. Kastenbauer E**
Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich.
HNO 31 (1983) 371-380
- 91. Kornberg A, Dietz O, Mau H, Pascher A, Stangl M, Scheele J, Hammer C**
Impact of immunoadsorption on xenogenic extracorporeal pig liver perfusion: assessment of organ function during autologous reperfusion.
Xenotransplantation 6 (1999) 187-193
- 92. Kraus W**
Magnetic field therapy and magnetically induced electrostimulation in orthopedics.
Orthopäde 13 (1984) 78-92
- 93. Kraus W, Lechner F**
Healing of pseudoarthrosis and spontaneous fractures with structure-

forming electrodynamic potentials.
Münch Med Wochenschr 114 (1972) 1814-1819

94. **Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC**
Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype.
J Cell Biol 93 (1982) 751-757
95. **Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK**
Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology.
J Cell Biol 93(1982) 743-750
96. **Kühnel W**
Knorpelgewebe.
In: „Taschenatlas der Zytologie und Mikroskopischen Anatomie“, Kühnel W, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage (1992) 116-121
97. **Kuttenberger JJ, Hardt N**
Long-term results following reconstruction of craniofacial defects with titanium micro-mesh systems.
J Maxillofac Surg 29 (2001) 75-81
98. **Landry PS, Sadasivan KK, Marino AA, Albright JA.**
Electromagnetic fields can affect osteogenesis by increasing the rate of differentiation.
Clin Orthop (1997) 262-270
99. **Langman J**
Experimentelle Embryologie – Wachstum.
In: „Medizinische Embryologie“, Langman J, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage (1989) 407
100. **Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Grattagliano V, Covelli M, Patella V, Lo Bianco G, Pipitone V**
Chondrocyte phenotyping in human osteoarthritis.
Clin Rheumatol 17 (1998) 99-104
101. **Layman DL, Sokoloff L, Miller EJ**
Collagen Synthesis by articular chondrocytes in monolayer culture.
Exp Cell Res 73 (1972) 107-112
102. **Lee DA, Bentley G, Archer CW**
The control of cell division in articular chondrocytes.
Osteoarthritis Cartilage 1 (1993) 137-146
103. **Leonhardt H**
Binde- und Stützgewebe.
In: „Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen“, Leonhardt H, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 8. Auflage (1990) 133-137

- 104. Liboff AR, Williams T, Strong DM, Wistar R**
Time- Varying Magnetic Fields: Effects on DNA Synthesis.
Science 223 (1984) 818-819
- 105. Liburdy RP, Sloma TR, Sokolic R, Yaswen P**
ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER+ breast cancer cell proliferation.
J Pineal Res 14(1993) 89-97
- 106. Lisanby SH, Kinnunen LH, Crupain MJ**
Applications of TMS to therapy in psychiatry.
J Clin Neurophysiol Aug 19 (2002) 344-360
- 107. Liu H, Abbott J, Bee JA**
Pulsed electromagnetic fields influence hyaline cartilage extracellular matrix composition without affecting molecular structure.
***Osteoarthritis Cartilage* 4 (1996) 63-76**
- 108. Liu H, Lees P, Abbott J, Bee JA**
Pulsed electromagnetic fields preserve proteoglycan composition of extracellular matrix in embryonic chick sternal cartilage.
Biochim Biophys Acta 1336 (1997) 303-314
- 109. Löffler G**
Kohlenhydrate.
In: „Physiologische Chemie“, Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage (1990) 881-899
- 110. Long V, Lo LJ, Chen YR**
Facial reconstruction after a complicated gunshot injury.
Chang Gung Med J 25 (2002) 557-562
- 111. Lorenz RR, Papay FA, Jatla M, Barthel SW, Seeley BM, Ulusal BG**
Hydroxyapatite cement reconstruction in the growing craniofacial skeleton: an experimental model.
J Craniofac Surg 13 (2002) 802-808
- 112. Löscher W, Mevissen M, Lehmacher W, Stamm A**
Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field.
Cancer Lett 71(1993) 75-81
- 113. Löschinger M, Thumm S, Hämmerle H, Rodemann HP**
Stimulation of protein kinase A activity and induced terminal differentiation of human skin fibroblasts in culture by low-frequency electromagnetic fields.
Toxicol Lett 96-97 (1998) 369-376
- 114. Maor G, Silbermann M**
Supraphysiological concentrations of dexamethasone induce elevation of calcium uptake and depression of [3H]-thymidine incorporation into DNA in cartilage in vitro.
Calcif Tissue Int 39 (1986) 284-290

- 115. Marchisio PC, Capasso, Nitsch L, Cancedda R, Gionti E**
Cytoskeleton and Adhesion Patterns of Cultured Chick Embryo Chondrocytes During Cell Spreading and Rous Sarcoma Virus Transformation.
Exp Cell Res 151 (1984) 332-343
- 116. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE**
Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D and BMP-2 during 3D cultivation.
J Cell Biochem 25 (2001) 121-128
- 117. McDonald F**
Effect of static magnetic fields on osteoblasts and fibroblasts in vitro.
Bioelectromagnetics 14 (1993) 187-196
- 118. Mertens J, Ullman U**
Clinical and bacteriological investigations of Cialit-preserved ossicles.
Eur Arch Otorhinolaryngol 245 (1988) 355
- 119. Mevissen M, Stamm A, Buntenkotter S, Zwingelberg R, Wahnschaffe U, Loscher W**
Effects of magnetic fields on mammary tumor development induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats.
Bioelectromagnetics 14 (1993) 131-143.
- 120. Milz S, Regner F, Putz R, Benjamin M**
Expression of a wide range of extracellular matrix molecules in the tendon and trochlea of the human superior oblique muscle.
Invest Ophthalmol Vis Sci 43 (2002) 1330-1334
- 121. Minuth WW, Rudolph U**
A compatible support system for cell culture in biomedical research.
Cytotechnology 4 (1990) 181-189.
- 122. Minuth WW, Stockl G, Kloth S, Dermietzel R**
Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions.
Eur J Cell Biol 57(1992) 132-137
- 123. Nakajima H, Kishi T, Tsuchiya Y, Yamada H, Tajima S**
Exposure of fibroblasts derived from keloid patients to low-energy electromagnetic fields: preferential inhibition of cell proliferation, collagen synthesis, and transforming growth factor beta expression in keloid fibroblasts in vitro.
Ann Plast Surg 39 (1997) 536-541
- 124. Naumann A, Dennis J, Staudenmaier R, Rotter N, Aigner J, Ziegelaar B, Happ T, Rasp G, Caplan AI**
Mesenchymal stem cells- a new pathway for tissue engineering in reconstructive surgery.
Laryngorhinootologie 81 (2002) 521-527

- 125. Nicolakis P, Kollmitzer J, Crevenna R, Bittner C, Erdogmus CB, Nicolakis J**
Pulsed magnetic field therapy for osteoarthritis of the knee—a double-blind sham-controlled trial.
Wien Klin Wochenschr 114 (2002) 678-684
- 126. Nindl G, Swez JA, Miller JM, Balcavage WX**
Growth stage dependent effects of electromagnetic fields on DNA synthesis of Jurkat cells.
FEBS Lett 414 (1997) 501-506
- 127. Norton LA**
Effects of a Pulsed Electromagnetic Field on a Mixed Chondroblastic Tissue Culture.
Clin Orthop 167 (1982) 280-290
- 128. Norton LA**
Pulsed Electromagnetic Field Effects on Chondroblast Culture.
Reconstr. Surg Traumat 19 (1985) 70-86
- 129. Nossol B, Buse G, Silny J**
Influence of weak static and 50 Hz magnetic fields on the redox activity of cytochrome-C oxidase.
Bioelectromagnetics 14 (1993) 361-372
- 130. Noth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS**
In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells.
Tissue Eng 8 (2002) 131-144
- 131. Olsen JH**
Etude epidemiologique sur l'apparition du cancer chez les enfants exposes a des lignes electriques a hautes tension.
In: "La pollution electromagnetique et la sante" Lannoye P (ed.), Frison-Roche, Paris (1994) 117-126
- 132. Pak MW, Chan ES, van Hasselt CA**
Late complications of nasal augmentation using silicone implants.
J Laryngol Otol 112 (1998) 1074-1077
- 133. Pape HD, Gerlach KL, Schippers CH**
Ergebnisse der Unterkieferrekonstruktion mit autogenen freien Knochen- und Kiefertransplantaten.
Fortschr Kiefer Gesichtschir 39 (1994) 78-81
- 134. Petrides PE**
Binde- und Stützgewebe.
In: „Physiologische Chemie“, Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage (1990) 881-899
- 135. Pezzetti F, De Mattei M, Caruso A, Cadossi R, Zucchini P, Carinci F, Traina GC, Sollazzo V.**
Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an in

- vitro study.
Calcif Tissue Int 65 (1999) 396-401
- 136. Pitzke P, Bujía J, Wilmes E, Hammer C**
Expression of ICAM-1 on isolated human nasal, auricular and costal chondrocytes.
Acta Otolaryngol 114 (1994) 81-86
- 137. Porstmann T, Kiessig ST**
Enzyme immunoassay techniques. An overview.
J Immunol Methods 150 (1992) 5-21
- 138. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S**
Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response.
J Immunol Methods 82 (1985) 169-179
- 139. Quatela VC, Sherris DA, Rosier RN**
The human auricular chondrocyte. Responses to growth factors.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 119 (1993) 32-37
- 140. Radin EL, Burr DB**
Hypothesis: Joints can heal.
Semin Arthritis Rheum 13 (1984) 293-302
- 141. Raphael KG, Marbach JJ, Wolford LM, Keller SE, Bartlett JA**
Self-reproted systemic, immune-mediated disorders in patients with and without proplast-teflon implants of the temporomandibular joint.
J Oral Maxillofac Surg 57 (1999) 364-370
- 142. Rasp G, Staudenmaier R, Ledderose H, Kastenbauer E**
Autologous rib cartilage harvesting: operative procedure and postoperative pain reduction.
Laryngorhinootologie 79(2000) 155-159
- 143. Reddi SP, Stevens MR, Kline SN, Villanueva P**
Hydroxyapatite cement in craniofacial trauma surgery: indications and early experience.
J Craniomaxillofac Trauma 5 (1999) 7-12
- 144. Reiter RJ.**
Melatonin suppression by static and extremely low frequency electromagnetic fields: relationship to the reported increased incidence of cancer.
Rev Environ Health 10 (1994) 171-186
- 145. Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, Rosebury WS, Anderson MK, Kuipers PJ, Ryan MJ**
Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma: local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture.
Circ Res 86 (2000) 101-108

- 146. Rettinger G**
Autogene und allogene Knorpeltransplantate in der Kopf-und Halschirurgie (ohne Mittelohr und Trachea).
Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl 1 (1992) 127-162
- 147. Risbud MV, Sittinger M.**
Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation.
Trends Biotechnol 20 (2002) 351-356
- 148. Rodan GA, Bourret LA, Norton LA**
DNA Synthesis in Cartilage Cells IS Stimulated by Oscillating Electric Fields
Science 199 (1978) 690-692
- 149. Rodemann HP, Bayreuther K, Pfeleiderer G**
The differentiation of normal and transformed human fibroblasts in vitro is influenced by electromagnetic fields.
Exp Cell Res 182 (1989) 610-621
- 150. Rothwell AG, Bentley G**
Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage.
J Bone Joint Surg Br 55 (1973) 588-594
- 151. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M**
Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage.
J Biomed Mater Res 42 (1998) 347-356
- 152. Ryaby JT**
Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing.
Clin Orthop Suppl 355 (1998) 205-215
- 153. Sakai A, Suzuki K, Nakamura T, Norimura T, Tsuchiya T**
Effects of Pulsing electromagnetic fields on cultured cartilage cells.
Int Orthop 15 (1991) 341-346
- 154. Saringer W, Nobauer-Huhmann I, Knosp E**
Cranioplasty with Individual Carbon Fibre Reinforced Polymere (CFRP) Medical Grade Implants Based on CAD/CAM Technique.
Acta Neurochir 144 (2002) 1193-1203
- 155. Savitz DA**
Health effects of electric and magnetic fields: are we done yet?
Epidemiology 14 (2003) 15-17
- 156. Schätzl M**
Magnetische Kernspinresonanz- Tomographie (MR- Tomographie).
In: „Radiologie I“ Lissner J, Fink U, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 4. Auflage (1992), 97-101

- 157. Seidel MF, Keck R, Vetter H**
ICAM-1/LFA-1 expression in acute osteodestructive joint lesions in collagen-induced arthritis in rats.
J Histochem Cytochem 45 (1997) 1247-1253
- 158. Sittinger M, Bräunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujía J**
Proliferative potential of nasal septum chondrocytes for in vitro culture of cartilage transplants.
Laryngorhinootologie 76 (1997) 96-100
- 159. Sittinger M, Schultz O, Keyszer G, Minuth WW, Burmester GR**
Artificial tissues in perfusion culture.
Int J Artif Organs 20 (1997) 57-62
- 160. Skalak R, Fox CF (eds.)**
Tissue Engineering.
In: "Tissue Engineering", Alan R Liss Inc. New York (1988) preface page XX
- 161. Sokoloff L**
Factors Influencing Cell Division in Cartilage.
In: "Degenerative Joints", Verbruggen G, Veys EM (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985) 47-53
- 162. Solursh M**
Formation of cartilage tissue in vitro.
J Cell Biochem 45 (1991) 258-260
- 163. Staudenmaier R, Grevers G, Kastenbauer E**
Local reconstruction of partial auricular defects.
Laryngorhinootologie 80 (2001) 655-661
- 164. Stubbe J**
Radicals in biological catalysis.
Biochemistry 27 (1988) 3893-3900
- 165. SundarRaj N, Fite D, Ledbetter S, Chakravarti S, Hassel JR**
Perlecan is a Component of Cartilage Matrix and Promotes Chondrocyte Attachment.
J Cell Science 108 (1995) 1663-2672
- 166. Verschaeve L**
Can non ionizing radiation induce Cancer?
Cancer J 8 (1995) 237-249
- 167. Verschaeve L, Maes A**
Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields.
Mutat Res 410 (1998) 141-165
- 168. von der Mark K**
Differentiation, Modulation and Dedifferentiation of Chondrocytes.
Rheumatologie 10 (1986) 272-315

- 169. von der Mark K, Gauss B, von der Mark H, Müller P**
Relationship between shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.
Nature 267 (1977) 531-532
- 170. Walleczek J, Budinger TF**
Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity.
FEBS Lett 314 (1992) 351-355
- 171. Wertheimer N, Leeper E**
Electrical wiring configurations and childhood cancer.
Am J Epidemiol 109 (1979) 273-284
- 172. Wertheimer N, Leeper E**
Magnetic field exposure related to cancer subtypes.
Ann N Y Acad Sci 502 (1987) 43-54
- 173. Wertheimer N, Savitz DA, Leeper E**
Childhood cancer in relation to indicators of magnetic fields from ground current sources.
Bioelectromagnetics 16 (1995) 86-96
- 174. White RE**
The involvement of free radicals in the mechanisms of monooxygenases.
Pharmacol Ther 49 (1991) 21-42
- 175. Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP**
Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo.
Gut 49 (2001) 577-583
- 176. Wilmes E, Gürtler L, Wolf H**
Zur Übertragung von HIV Infektionen durch allogene Transplantate.
Laryngorhinootologie 66 (1987) 332-334
- 177. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P**
Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs.
J Biomed Mater Res 63(2002) 115-121
- 178. Wintermantel E**
Materials and Processes.
Aachen Biomaterials Conference 1998, Aachen (1998) keynote lecture
- 179. Wustrow TP, Kastenbauer E**
Wie ich es mache: Zur Nomenklatur der Transplantation in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde.
Laryngorhinootologie 70 (1991) 387-388

- 180. Zalzal GH**
Rib cartilage grafts for the treatment of posterior glottic and subglottic stenosis in children.
Ann Otol Rhinol Laryngol 97 (1988) 506-511
- 181. Zeilhofer HF, Sader R, Fruh HJ, Neff A, Horch HH**
Possibilities and indications for carbon fiber reinforced synthetic materials for designing individual implants for reconstruction of the facial bones and skull.
Biomed Tech 42 Suppl (1997) 361-362
- 182. Zeilhofer HF, Sader R, Kliegis U, Neff A, Horch HH**
Accuracy of stereolithographic models for surgery planning.
Biomed Tech Suppl 42 (1997) 349-351
- 183. Zöllner R**
Aluminiumoxidkeramikspangen in der Trachealchirurgie.
Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde und Kopf-Hals-Chirurgie, 1982 (Abstract)

9. Danksagung

Besonders herzlich danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Ernst Kastenbauer für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Mittel für die Durchführung der Zellkulturversuche in der HNO-Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkranke des Universitätsklinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gleichermaßen danke ich Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Hans-Florian Zeilhofer dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des bayerischen Forschungsverbundes für Tissue Engineering und Rapid Prototyping – FORTEPRO tätig zu sein. Dadurch ist es mir möglich, meine Forschungstätigkeit auf dem Gebiet des Tissue Engineering in enger Kooperation mit der HNO-Forschungsabteilung der LMU München fortzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Kathrin Lempart und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der HNO-Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkranke der LMU München für Ihre immer freundliche und hochqualifizierte Unterstützung bei der Durchführung der Zellkulturen und der immunhistochemischen Färbungen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. (UMF Temeschburg) Hans-Henning Horch danken. Er hat es mir ermöglicht, im Rahmen meiner Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Technischen Universität München meine Kenntnisse auf dem Gebiet der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und angrenzender Fachgebiete zu vertiefen, wodurch es mir möglich war, die klinische Relevanz von Knorpel- und Knochendefekten im Kopf-Hals Bereich zu erkennen, die die Grundlage für die vorliegende Dissertation bildet.

Des weiteren danke ich Herrn Dipl.- math. Horst Wawrzyn, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Hightech-Forschungs-Zentrum – Center of Advanced Studies in

Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Herrn Dr. Rainer Staudenmaier, Frau Dr. Dr. Katja Schwenzer, Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Robert Sader und Frau Dr. Inga Bensele danke ich für die Durchsicht und konstruktive Kritik an der vorliegenden Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich für die fürsorgliche Unterstützung danken, die mir das Medizinstudium ermöglichte.

Lebenslauf

Name: Philipp Christian Jürgens
Geburtstag: 13. Januar 1974
Geburtsort: Hannover

Schulische Ausbildung:

1980-1984 Grundschule Grimsehlweg, Hannover
1984-1986 Orientierungsstufe Lüerstraße, Hannover
1986-1993 Theresien-Gymnasium, München

Beruflicher Werdegang:

1993-1999 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig- Maximilians- Universität München
01.12.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2000-7/2001 Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der Klinik und
Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie der TU
München, Klinikum rechts der Isar.
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. H.-H. Horch)
01.08.2001 Erlangung der Ärztlichen Approbation
8/2001-9/2002 Medizinische Beratung bei Kongressorganisationen
und medizinischen Internetseiten
seit 10/2001 Studium der Zahnmedizin an der
Ludwig- Maximilians- Universität München
seit 10/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Geschäftsführer
des Bayerischen Forschungsverbundes für Tissue
Engineering und Rapid Prototyping – FORTEPRO
(Sprecher: Prof. Dr. Dr. H.-F. Zeilhofer)