

Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität  
München, Klinikum rechts der Isar  
(Direktor : Univ.- Prof. Dr. J.R. Siewert)

Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie  
(Vorstand : Univ.- Prof. Dr. E. Biemer)

## **Präfabrizierter Lappen im Kaninchenmodell - Autologes Tissue Engineering von Knorpel an verschiedenen Implantationsorten**

Nikolaus Maximilian Miehle

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. Univ.- Prof. Dr. E. Biemer  
2. Priv.- Doz. Dr. R. E. Giunta

Die Dissertation wurde am 25.7.2005 bei der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für  
Medizin  
am 8.2.2006 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

- 1. Einleitung**
- 2. Status Quo des Tissue Engineering von Knorpelgewebe**
  - 2.1. Physiologie
  - 2.2. Experimentelle Ansätze
  - 2.3. Technik des Tissue Engineering
- 3. Der präfabrizierte Lappen**
- 4. Ziel der Arbeit**
- 5. Material und Methoden**
  - 5.1. Studienkonzept
  - 5.2. In vitro Generierung der Zell- Biomaterial- Konstrukte
    - 5.2.1. Trägermaterial Hyaff 11®
    - 5.2.2. Zellisolation
    - 5.2.3. Monolayerkultur und Zellvermehrung
    - 5.2.4. Zell- Biomaterial- Konstruktherstellung und - kultivation
  - 5.3. In vivo Versuchsablauf
    - 5.3.1. Knorpelentnahme
    - 5.3.2. Anlegen des präfabrizierten Lappen und Konstruktimplantation
      - 5.3.2.1. Anästhesie
      - 5.3.2.2. Operatives Vorgehen
    - 5.3.3. Knorpelimplantation und - nachbereitung
  - 5.4. Auswertung
    - 5.4.1. Selektive Mikroangiografie
    - 5.4.2. Histochemie
      - 5.4.2.1. Alcianblaufärbung

- 5.4.2.2. Toluidinblaufärbung
- 5.4.2.3. Azanfärbung
- 5.4.3. Immunhistochemie
  - 5.4.3.1. Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische- Phosphatase (APAAP)
  - 5.4.3.2. Peroxidase- Anti- Peroxidase- Immunhistochemie
- 5.5.3. Vitalitätstest auf Fluoreszenzbasis

## **6. Ergebnisse**

### **6.1. Komplikationen und Ausfallquote**

### **6.2. In vitro Ergebnisse**

- 6.2.1. Chondrozytengewinnung und - vitalität
- 6.2.2. Monolayerkultur
- 6.2.3. Besiedelung der Zellträger und Kultivation
- 6.2.4. Zell- Biomaterial- Konstrukte in stationärer Kultur

### **6.3. In vivo Ergebnisse**

- 6.3.1. Ergebnisse nach 6 und 12 Wochen Implantationszeit
  - 6.3.1.1. Makroskopischer Aspekt allgemein
  - 6.3.1.2. Intraindividuelle Kontrolle
  - 6.3.1.3. Subkutane Implantation
  - 6.3.1.4. Intramuskuläre Implantation
  - 6.3.1.5. Implantation in einen freien präfabrizierten Bauchhautlappen
  - 6.3.1.6. Mikroangiografische Untersuchung
- 6.4. Zusammenfassung Ergebnisse

## **7. Diskussion**

### **7.1 Amplifikation und Differenzierungsverhalten der Chondrozyten**

### **7.2 Bewertung Biomaterial und Modell**

### **7.3 Bewertung der Neofabrikation eines Lappens**

### **7.4 Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung**

7.4.1. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung subkutan

7.4.2. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung intramuskulär

7.4.3. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung im präfabrizierten  
Lappen

7.4.4. Zusammenfassende Bewertung der Knorpelkonstrukte bezgl.  
der unterschiedlichen Implantationsorte

### **7.5 Ausblick und Perspektiven von Tissue Engineering von Knorpel und des präfabrizierten Lappens**

## **8. Zusammenfassung**

## **9. Abbildung- und Tabellenverzeichnis**

## **10. Literaturverzeichnis**

## **11. Danksagung**

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzgl.	Bezüglich
°C	Celsius in Grad
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
I.E.	Interationale Einheiten
IGF	Insulin-like Growth Factor
Ig	Immunglobulin
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KV	Kilovolt
l	Liter
M	Molar
M.	Muskulus
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid

NAHCO <sup>3-</sup>	Natriumbikarbonat
OP	Operation
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
rpm	rounds per minute
TGF	Transforming Growth Factor
TU	Technische Universität
u.a.	unter anderem
V.	Vene
µm	Mikrometer

# 1. Einleitung

In der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie kommen zur Defektdeckung bei Knochen oder Knorpelverlust unterschiedliche synthetische und biologische Ersatzmaterialien zum Einsatz. Synthetische Materialien weisen neben dem Korrosionsvorgängen vor allem toxische oder allergische Reaktionen auf Zerfallsprodukte des verwendeten Materials auf, die manchmal eine Entfernung des verwendeten Materials bedingen (Berghaus 1992). Bei allogen oder xenogenem Material als biologisch verwendetes Ersatzmaterial kommt es oft zur Resorption durch Gefäß- und Bindegewebeinsprossung (Rettinger 1992) und letztlich besteht die Gefahr einer immunologischen Unverträglichkeit oder der Übertragung von Infektionskrankheiten sowie des Vitalitätsverlustes des Transplantates durch die Konservierungsverfahren (Bujia et al., 1992).

Bei Ersatz von Knorpelgewebe zeigen sich unter der Verwendung von autologem Material bisher die besten Ergebnisse (Elwany 1985). Treten Infektionen bei der Implantation autologen Knorpels auf, sind diese v.a. auf Ernährungsstörungen und Infektionen des implantierten Knorpels zurückzuführen (Hellmich 1982). Generell ist jedoch die Verfügbarkeit autologer Transplantate limitiert durch die körpereigenen Vorräte. Ein Ansatz, diesen Bedarf an autologem Ersatzmaterial in Zukunft decken zu können ist der Einsatz neuer Verfahren des Tissue Engineering. Nicht zuletzt spielen beim Transplantat Eigenschaften wie Form, Größe und Zusammensetzung des Transplantates ebenso wie unterschiedliche mechanische Einflüsse des Implantationsortes eine wichtige Rolle für das Gelingen der Transplantation (Kastenbauer 1983).

Dem Einsatz unterschiedlicher Materialien steht eine Reihe von verschiedenen Rekonstruktionsverfahren zur Deckung von Knorpel- oder Knochendefekten gegenüber, deren Auswahl individuell bedacht werden muß, um die Lebensqualität des verletzten Patienten zu erhalten (Stock et al., 1994). Es existieren unterschiedliche Lappentechniken wie der Verschiebelappen, der freie Lappen oder der freie Lappen mit mikrovaskulärer Anastomose (Hammer und Bujia 1992). Einen relativ neuartigen Ansatz stellt der mikrovaskuläre präfabrizierte freie Lappen dar. Nach der subkutanen Implantation eines Gefäßstiels kommt es über eine Gefäßausprossung zu einem Anschluß an das örtliche Gefäßsystem. Eine Studie

konnte eine ausreichende Blutversorgung des neu geschaffenen freien Hautlappens über einen implantierten Gefäßstiel nach acht bis zehn Tagen bei Kaninchen zeigen (Klöppel et al., 1997). In einem zweiten Schritt kann dieser Lappen mit dem Gefäßstiel gehoben werden und zur Deckung von Defekten verwendet werden. Jedoch ist die regelmäßig stattfindende Anbindung des Gefäßstiels an das lokale Gefäßnetz im gefäßgestielten präfabrizierten Gewebelappen noch nicht vollständig verstanden, so daß es weiterer Untersuchungen bedarf (Hoang 1997). Andererseits kann die Idee der präfabrizierten Lappenplastik heute auch erfolgreiche klinische Anwendungen vorweisen (Khouri et al., 1991; Pribaz und Fine 2001).

In der vorliegende Arbeit soll autologes Tissue Engineering von Knorpel im Kaninchensystem an unterschiedlichen Implantationsorten u.a. in einem präfabrizierten Bauchhautlappen untersucht werden.

## **2. Status Quo des Tissue Engineering von Knorpelgewebe**

### **2.1. Physiologie**

Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten, extrazellulärer Matrix und dem Perichondrium. Das druckfeste avaskuläre Stützgewebe wird je nach unterschiedlicher extrazellulärer Matrix in einen hyalinen, elastischen und Faserknorpel unterteilt und kommt sowohl in Gelenken, im Rippenbogen als auch im Atemtrakt vor (Leonhardt 1990).

Die Chondrozyten sind in Gruppen angeordnet und umgeben vom einer Chondroitinsulfatkapsel und einem Zellhof aus kollagenen Fasern. Diese Komplexe kann man lichtmikroskopisch als Chondrone erkennen (Kühnel 1992), sie stellen die kleinste funktionelle Einheit des Knorpels dar und sind umgeben von einer basophilen Knorpelkapsel (Leonhardt 1990). Diese Chondrone geben u.a. dem hyalinen Knorpel seine Druckelastizität.

---

Die gesamte extrazelluläre Matrix des fertigen Knorpels setzt sich aus Proteoglykanen, Wasser und Kollagen zusammen. Das Kollagen macht einen großen Teil des Trockengewichts und den größten Teil des Proteingehalts des Knorpels aus und ist ebenso wie die Proteoglykane ein Produkt der Chondrozyten. Typ II ist der vorherrschende Kollagen- Isotyp im Knorpelgewebe. Die Proteoglykane bestehen aus einer Proteinstruktur und kovalent gebundenen Heteroglykanketten, die auch als Glykosaminoglykane (GAGs) bezeichnet werden. Als dominierende GAGs kommen Hyaluronsäure, Chondroitin-4-Sulfat und Keratansulfat im Knorpel vor, wobei Chondroitin-4-Sulfat bis zu 40% des Trockengewichtes von Knorpelgewebe ausmachen kann (Löffler 1985). Die extrazelluläre Matrix ist als Kittsubstanz für die Stabilität und Elastizität des Knorpels verantwortlich.

Das Perichondrium besteht aus Fibrozyten und Bindegewebsfasern. Knorpelgewebe ist nicht vaskularisiert. Die Ernährung des bradytrophen Gewebes erfolgt durch Diffusion über die extrazelluläre Matrix (Leonhardt 1990). Nährstoffe gelangen über das gefäßreiche Perichondrium zum Knorpelgewebe.

Über eine Metaplasie von perichondrialen Bindegewebszellen zu Chondrozyten ist das Perichondrium auch für die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Knorpels verantwortlich (Radin und Burr 1984). Am Gelenkknorpel fehlt das Perichondrium. Aus diesem Grund kann der Gelenkknorpel nicht regeneriert werden (Moll 1995).

Entscheidend für das Größenwachstum des Knorpelgewebes ist die Volumenzunahme durch die Interzellulärsubstanz (Langmann 1985) sowie das appositionelle Wachstum durch Umwandlung von perichondrialen Fibroblasten zu Chondrozyten.

Die differenzierten Chondrozyten zählen zellkinetisch zu den reversibel postmitotisch fixierten Zellen, die sich unter physiologischen Bedingungen nicht mehr teilen (Dustmann et al., 1974). Bei einer Knorpelläsion nach Abschluß des Knorpelwachstums wird diese Stelle mit perichondrialen Bindegewebszellen aufgefüllt. Diese können sich aber nur zu einem kleinen Teil metaplastisch zu Knorpelzellen umwandeln (Radin und Burr 1984).

## 2.2. Experimentelle Ansätze

In der Medizin, besonders in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie, besteht ein großer Bedarf an Ersatzmaterialien, um Defekte unterschiedlichster Art wie z.B. im Knochen oder im Knorpel zu decken.

Eine relativ neuartige Forschungsgebiet, das sog. Tissue Engineering als interdisziplinäres Forschungsgebiet zwischen Medizinern, Naturwissenschaftlern und Biomaterialforschern eröffnet u.a. Perspektiven in der in vitro Züchtung autologer artifiziereller Ersatzgewebe. Das Tissue Engineering von Knorpel bleibt aber ein noch nicht voll in die Klinik integriertes Feld.

Es gibt bisher viele Studien über das Verhalten von allogenen- gezüchteten Konstrukten mit subkutaner Implantation (Cao et al., 1997; Cima et al., 1991; Freed et al., 1993; Grande et al., 1997; Mooney et al., 1996; Puelacher et al., 1994; Vacanti 1991). In diesen Studien wurden Chondrozyten vom Rind oder menschlichen Ursprunges auf Trägergerüste gesät und die Knorpelentwicklung wurde im Nacktmausmodell studiert. Jedoch bleiben in diesem System physiologische und immunologische Vorgänge, wie z. B. Entzündungs- oder Fremdkörperreaktionen unberücksichtigt.

Weniger ist bekannt über Versuche im autologen Tiermodell (Britt und Park 1998; Cao et al., 1998; Park und Ward 1995), in denen die Konstrukte entweder in Kaninchen oder Schweine implantiert wurde. In diesen Studien wurden die Konstrukte mit unterschiedlichen Biomaterialien hergestellt und Chondrozyten aus dem Ohr wurden subkutan implantiert. Die Chondrozyten des gesamten Ohr wurden isoliert und wurden nicht vermehrt, was aus klinischen Aspekten unerlässlich bleibt, bevor sie in die Biomaterialien gesät wurden. Probleme, wie die De- und Redifferenzierung der Zellen wurden in den meisten Studien nicht berücksichtigt. Die Explantate zeigten eine Produktion von Knorpelmatrix unterschiedlichen Ausmaßes. Es werden Deformationen, Resorptionsprozesse oder ein Vitalitätsverlust der Implantate nach heterotroper Implantation beschrieben (Britt und Park 1998).

Knorpelkonstrukte, die mit Polyglykolsäure oder Kalziumalginate als Zellträger gezüchtet wurden, zeigten eine signifikante Entzündungsreaktion und Fremdkörperreaktion im immunkompetenten Schweinemodell (Britt und Park 1998, Cao et al., 1998).

## 2.3. Technik des Tissue Engineering

Beim Tissue Engineering von Knorpelgewebe gibt es unterschiedliche potentielle Ausgangsgewebe.

Es gibt unterschiedliche Wege, wie man Knorpel generieren kann. Man kann Perichondrium (ten Koppel et al., 1998; Pirsig et al., 1995; van Osch et al., 2000), mesenchymale Stammzellen (Pittenenger et al., 1999; Solchaga et al., 1999) oder Chondrozyten (Aigner et al., 1998; Rotter 1998; Riesle et al., 1998; Sadeeh et al., 1999) benutzen.

Im Hinblick auf die klinische Situation scheint das Tissue Engineering von autologen Knorpel mit vermehrten differenzierten Chondrozyten eine sehr vielversprechende Methode zu sein.

Der Ansatz mit differenzierten Chondrozyten beinhaltet die Entnahme von Zellen mittels einer Gewebebiopsie, anschließender Isolation und Vermehrung der Zellen in einer Kultur und letztlich bei ausreichend vorhandener Zellzahl die in vitro Formung über einen Zellträger zu einem dreidimensionalem Konstrukt.

Für die Züchtung von Knorpel aus differenzierten Chondrozyten unter klinischen Aspekten ist es nötig, Knorpelzellen aus einer kleinen Gewebebiopsie zu gewinnen, um einen großen Hebedefekt zu vermeiden. Ein weiterer Grund für eine kleine Gewebebiopsie ist oftmals eine fehlende Hebemöglichkeit. Diese isolierten Chondrozyten müssen zuerst vermehrt werden, um eine genügende Zellanzahl für das Besiedeln des Biomaterials zu erhalten (Aigner et al., 1998, Sittering et al., 1994). Bei der Vermehrung kommt es zu einer Dedifferenzierung, wobei die Chondrozyten ihren Phänotyp zum Fibroblasten verändern und anstatt des knorpelspezifischen Kollagen Typ II das bindegewebstypische Kollagen Typ I (Benya et al., 1978; von der Mark et al., 1977) produzieren. Um knorpelähnliches Gewebe zu erzeugen wird eine Redifferenzierung der Zellen angestrebt. Dies kann allein durch den Gebrauch eines dreidimensionalen Trägers erreicht werden (Aigner et al., 1998, Benya et al., 1982, Sittering et al., 1994,) oder durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF-beta (Bujia 1995) oder Osteogenin zusammen mit EGF, PDGF und FGF (Harrison et al., 1991).

Verschiedene Zellkulturmodelle and Zellnetze (Guo et al., 1989), welche den Prozess der Redifferenzierung induzieren und verstärken wurden bisher in Studien beschrieben (Aigner et al., 1998, Rotter et al., 1998, Homminga et al., 1993).

Bei der Auswahl eines geeigneten Trägermaterials sollten die Parameter Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit, Konsistenz und strukturelle Eigenschaft, sowie Sterilisierbarkeit berücksichtigt werden (Sittinger et al., 1994; Bujia 1995). Hierbei zeigte sich in vorangegangenen Studien, das ein Hyaluronsäurederivat (Hyaff 11®) in Form von einem nichtgewobenen Vlies sich für in vitro und in vivo Tissue Engineering von Knorpel eignet (Aigner et al., 1998, Campoccia et al., 1998, Solchaga et al., 1999).

### **3. Der präfabrizierte Lappen**

Die freie mikrovaskuläre Lappentechnik spielt heute in modernen rekonstruktiven Chirurgie eine wichtige Rolle. Häufig ergeben sich für eine lokale Lappenplastik Probleme bei der Deckung von Defekten aufgrund anatomischer Natur z.B. am Kopf oder aufgrund von Infektionen, die dazu zwingen ein defektfernes Spendergebiet zu wählen. Hierbei können die Transplantate aus einer oder mehreren Gewebearten bestehen (Erk et al., 1983, Itoh 1992). Es gibt drei Grundprinzipien für das Gelingen eines freien Gewebetransfers: Neben einer suffizienten Perfusion von Empfängerseite und einer perfekten Anastomose muß der Lappen ein suffizientes Gefäßbett verfügen (McKee et al., 1982). Viele Gewebe haben aber kein suffizientes Gefäßbett und die Gewebe mit geeignetem anatomischem Verlauf sind beim Menschen und gerade beim Polytraumatisierten oder Verbrennungspatient oft limitiert. Zu nennen ist auch der oftmals unbefriedigende ästhetische Aspekt bei zu dicken Gewebelappen bei der Rekonstruktion bei Nase und Ohr. Ein großes Problem ist die Versorgung eines Defektes mit mehreren Gewebetypen bestehend aus Haut, Knochen oder Knorpel.

Aufgrund dieser Probleme wurde begonnen durch Implantation eines ortsfremden autogenen Gefäßes u.a. gestielte Lappen unabhängig vom lokalen Gefäßverlauf zu schaffen (Hirase et al., 1988). Voraussetzung für eine ausreichende Versorgung des zu transplantierenden Lappens ist eine Neovaskularisation mit nachfolgender

Blutversorgung ausgehend von implantierten Gefäßstiels an das lokale Gefäßsystem. In einer experimentellen Studie konnte eine ausreichende Blutversorgung zwanzig Tage nach Gefäßimplantation und erfolgter Neovaskularisation nachgewiesen werden (Klöppel et al., 1997). Durch dieses Verfahren kann man sich bei der Auswahl der Entnahmeregion besser an der Gewebeschaffenheit des Defektes, an Gewebetyp u.a. orientieren als es bei freien Lappen möglich ist. Weiterhin ist es mit dieser Technik möglich kombinierte Transplantate unterschiedlicher Gewebe mit geringerer Hebmorbidity zu erhalten. Zusätzlich ist das Einbringen artifizieller oder heterologer Gerüstsubstanzen durchführbar zur Verbesserung der Rekonstruktion von z.B. der Nase (Klöppel 1994).

So stellen präfabrizierte neovaskularisierte Lappen eine relative Neuheit in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie dar (Falco et al., 1992; Hirase et al., 1988; Hörl et al., 1994, Khouri et al., 1991; Klöppel et al., 1997, Pribaz et al., 1999). Der erste Schritt dieser operativen Technik ist die Implantation eines durch eine Anastomose geschaffene Gefäßbogens in einen zufälligen Random Pattern Flap, der geeignet ist um Defekte zu decken. Innerhalb der nächsten 8-12 Tage wird der Lappen axial perfundiert über einen Anschluß des Gefäßstiels an das lokale Gefäßnetz (Klöppel et al., 1997). Daraus resultiert ein präfabrizierter neovaskularisierter Lappen, der in einem zweiten Schritt nun geeignet wäre für eine freie Lappentransplantation (Pribaz et al., 2001).

## **4. Ziel der Arbeit**

Bisher wurde Tissue Engineering von Knorpel mit isolierten Chondrozyten am immunsupprimierten Tiermodell untersucht. Nur autologe, immunkompetente Versuchsmodelle erlauben eine Beurteilung von Gewebeinteraktionen sowie entzündlichen Prozessen. Bisherige Studien am autologen Tiermodell, Kaninchen oder Schwein mit unterschiedlichen Biomaterialien waren ohne Vermehrung von Chondrozyten in Monolayerkulturen. Die sich hieraus bedingende De- und Redifferenzierung wird nicht berücksichtigt Die gezüchteten Knorpelkonstrukte wurden immer lediglich subkutan implantiert.

Die gegenwärtige Studie soll bezogen auf die spätere klinische Situation in der rekonstruktiven Chirurgie die oben genannten Punkte erfüllen und das Verhalten von Knorpelkonstrukten in Bezug auf unterschiedliche Proteoglykan- und Kollagensynthese an verschiedenen Implantationsorten unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen untersuchen.

Hierfür wurde eine kleine Knorpelbiopsie aus dem Kaninchenohr entnommen und das Perichondrium entfernt. Anschließend wurden vitale Knorpelzellen isoliert und in gewöhnlichen Monolayerkulturen vermehrt, bis sie eine gewisse Zellanzahl erreicht haben. Dann wurden sie auf den Zellträger gesäät. Nach ein paar weiteren Wochen in der Zellkultur waren stabile Konstrukte generiert. Es folgte die Implantation in das Kaninchen (Abb.1).

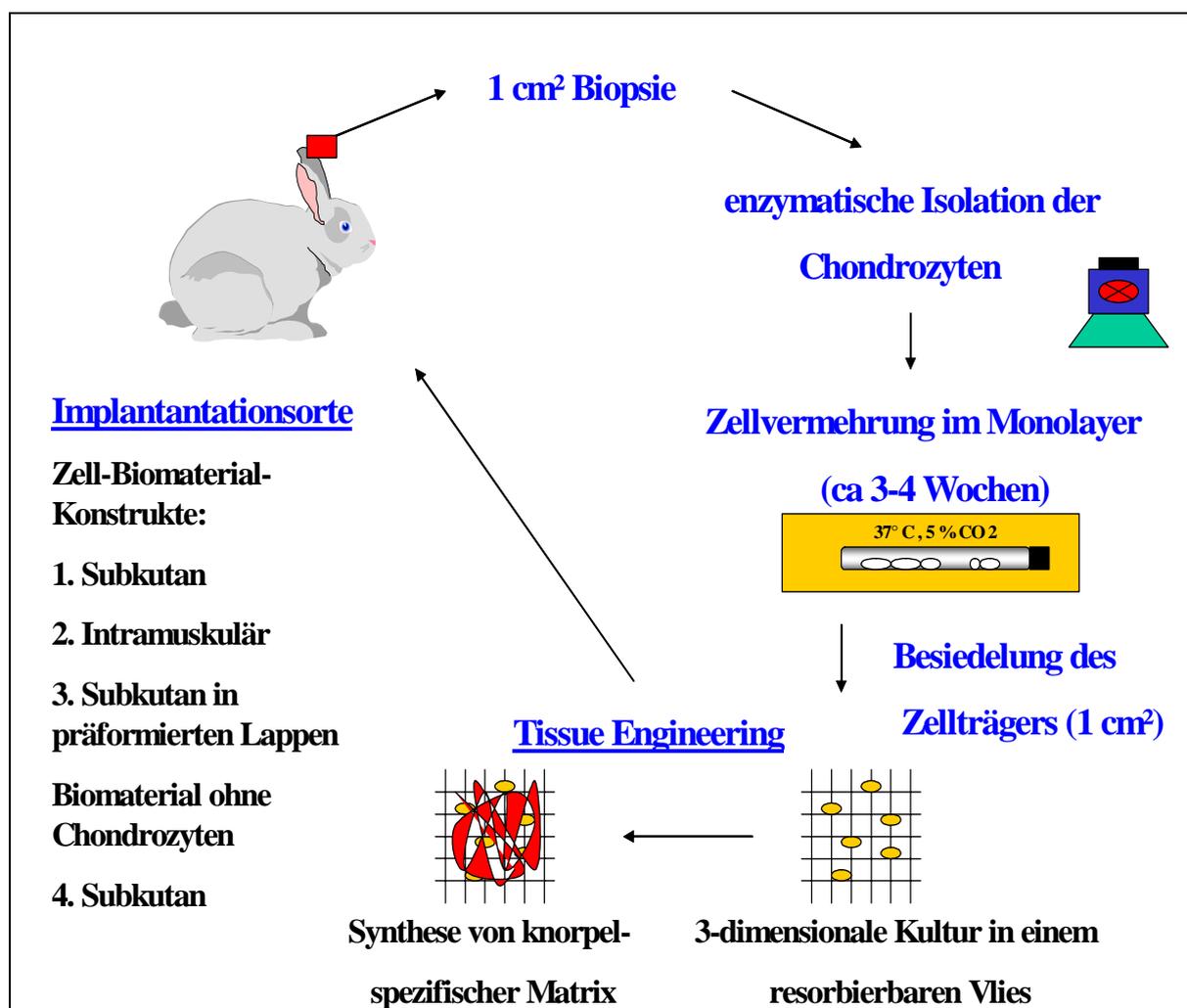
Ein subkutaner (laterale Bauchwand), ein intramuskulärer (M. rectus femoris) Implantationsort und eine Implantation in einen präfabrizierten Bauchhautlappen wurden gewählt:

1. Die subkutane Implantation: Die subkutane Implantation sah ein gut vaskularisiertes Gewebe mit geringem mechanischer Belastung vor.
2. Die intramuskuläre Implantation: Die intramuskuläre Implantation sah neben einer sehr gut vaskularisierten Umgebung eine mechanische Belastung und dynamischen Stress für die Konstrukte vor. Es sollte sich zeigen, ob die gezüchteten Konstrukte diesem mechanischen Streß überhaupt gewachsen sind. Jedoch könnte eine mechanische Belastung auch in einer höheren Synthese von knorpelspezifischen Proteoglykanen und Kollagenen resultieren (Parkinnen et.al., 1992, Quinn et al., 1998).
3. Die Implantation in einen präfabrizierten Bauchhautlappen: Die Implantation in einen präfabrizierten Lappen simulierte eine ziemlich oft gesehen Situation in der rekonstruktiven Chirurgie, wo die implantierten Konstrukte eine Ischämie in den ersten Wochen nach der Implantation erfahren ohne eine mechanische Belastung
4. Schließlich erfolgte eine Implantation eines Leervlieses, das nicht mit Chondrozyten besiedelt wurde, ebenfalls in die laterale Bauchwand. Dieses

Leervlies sollte als intraindividuelle Kontrolle dienen, um mögliche Reaktionen auf das Biomaterial zu testen.

Um in vitro Bedingungen mit in vivo Bedingungen vergleichen zu können, wurde in der Zwischenzeit ein weiteres Zell- Biomaterial- Konstrukt in einer Petrischale kultiviert. Hierfür wurde es für den gleichen Zeitraum in der Kultur belassen, wie die Konstrukte in vivo in dem Kaninchen.

Die verschiedenen Implantationsorte sollen unterschiedliche physiologische Bedingungen vorsehen, die sich auswirken könnten auf die Expression knorpelspezifischer Matrix, auf das Wachstum und die Reifung der Zell-Biomaterialkonstrukte. Die gewählten Implantationsorte stellen potentielle und relevante Implantationsorte an Patienten für einen möglichen klinischen Einsatz dar.



**Abb. 1:** Studienkonzept

## 5. Material und Methoden

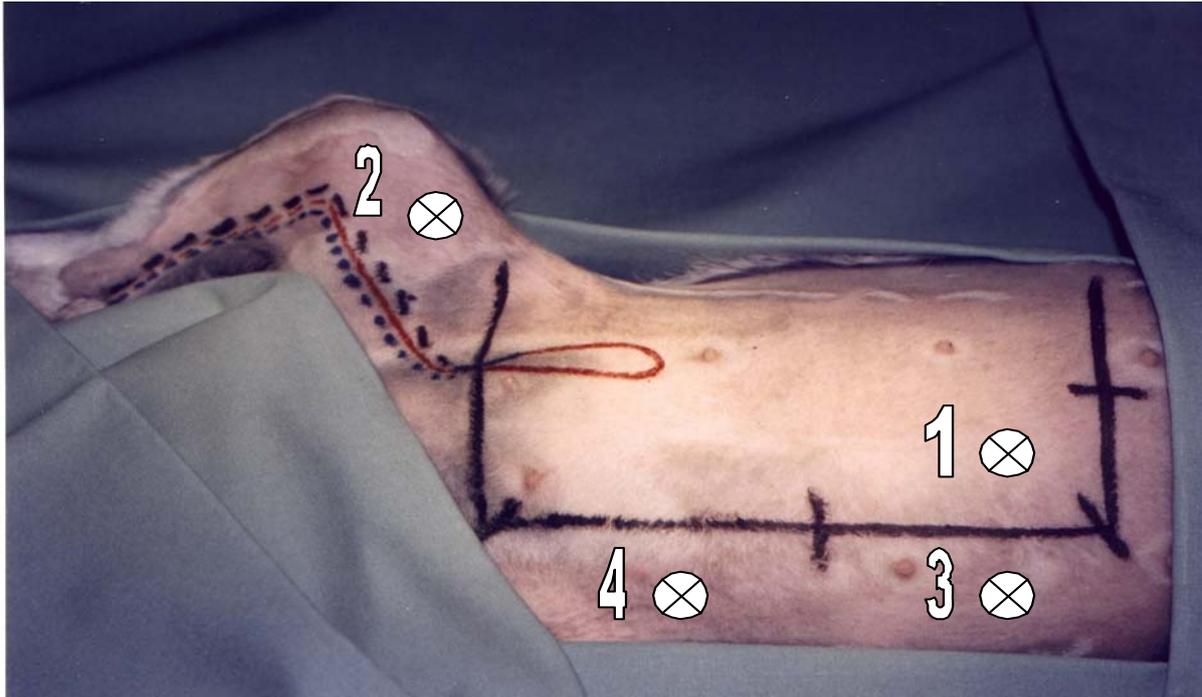
### 5.1. Studienkonzept

Das Grundkonzept (Abb. 1) der Studie bestand aus einer Entnahme einer 1cm<sup>2</sup> großen Biopsie von Ohrknorpel von Chinchilla Bastard Kaninchen und anschließender enzymatischer Isolation der Chondrozyten. Nach 4 Passagen der Zellvermehrung in Monolayerkulturen erfolgte eine Besiedelung der Zellen auf einen dreidimensionalen nichtgewebten Zellträger, bestehend aus einem Hyaluronsäurederivat (Aigner et al., 1998). Auf diesem Zellträger wurden die Zellen zusätzliche zwei Wochen in Petrischalen kultiviert. Vier ca. 1cm<sup>2</sup> große Konstrukte wurden generiert. Nach dieser Periode wurden drei der dreidimensionalen Zell-Biomaterialkonstrukte an folgenden Stellen des Kaninchens implantiert:

1. In subkutanes Gewebe der lateralen kranialen Bauchhaut
2. In intramuskuläres Gewebe des M. rectus femoris
3. In subkutanes Gewebe in einem präfabrizierten Bauchhautlappen

Für die Anlage des präfabrizierten Lappen wurde am Kaninchen ein Bauchhautlappen der Größe 15 x 8 cm mit lateraler Basis gehoben. Im weiteren wurde der Ober- und Unterschenkel medial inzidiert. Anschließend erfolgte die mikrochirurgische Präparation der A. femoralis und V. saphena magna im Verlauf bis zum Innenknöchel. Nach dem Absetzen des Gefäßstiels wurde das entstandene kaudale Ende in Höhe der Leiste mit der dort abgesetzten V. femoralis End-zu-End anastomosiert. Der entstandene Gefäßbogen („Loop“) wurde im nächsten Schritt nach oben unter die Bauchhaut geklappt und dort auf der Unterseite fixiert.

4. Zusätzlich wurde der Zellträger als Kontrolle ohne Chondrozyten in das subkutane Gewebe der lateralen kaudalen Bauchhaut implantiert (Abb. 2).



**Abb. 2:** Sediertes Kaninchen mit aufgezeichneten Schnittstellen und Implantationsorten:

1. Subkutan in Lappen, 2. Intramuskulär in M. rectus femoris, 3. Subkutan in laterale Bauchwand, 4. Kontrollvlies subkutan in laterale Bauchwand

Das vierte Zellbiomaterialkonstrukt wurde als stationäre Langzeitkontrolle in vitro in Petrischalen für die gleiche Dauer der in vivo Implantationen kultiviert.

Die Proben wurden nach 6 und 12 Wochen explantiert und anschließend morphologisch, histologisch und immunhistologisch untersucht. Zum Nachweis des Anschlusses des implantierten Gefäßstiels an das bestehende Gefäßsystem des Bauchhautlappens durch Neovaskularisation wurde zum Zeitpunkt der Opferung eine selektive Mikroangiografie mit Bariumsulfat durchgeführt.

Im Rahmen der Studie wurden 12 Chinchilla Bastard Kaninchen operiert. Es wurden 6 Tiere für einen sechswöchigen Zeitraum und 6 Tiere für einen zwölfwöchigen Zeitraum festgesetzt. Es wurden männliche und weibliche Tiere im Alter zwischen 10 Monaten und 1 Jahr operiert, das Gewicht der Tiere lag zwischen 2,5 und 3,5 kg.

Alle Tiere wurden im Rahmen eines erweiterten Antrages des Projektes 95/038 (Regierung von Oberbayern) zwischen November 1998 und Juli 2000 im Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München operiert.

---

Diese Studie wurde neben einer Versuchsreihe über den präfabrizierten Lappen (Hoang 1997, Schweinbeck 1999, Werner 1999) durchgeführt, in dessen Rahmen 16 Tiere zum Erlernen des Operationsmodells operiert wurden.

## **5.2. In vitro Generierung der Zell- Biomaterial- Konstrukte**

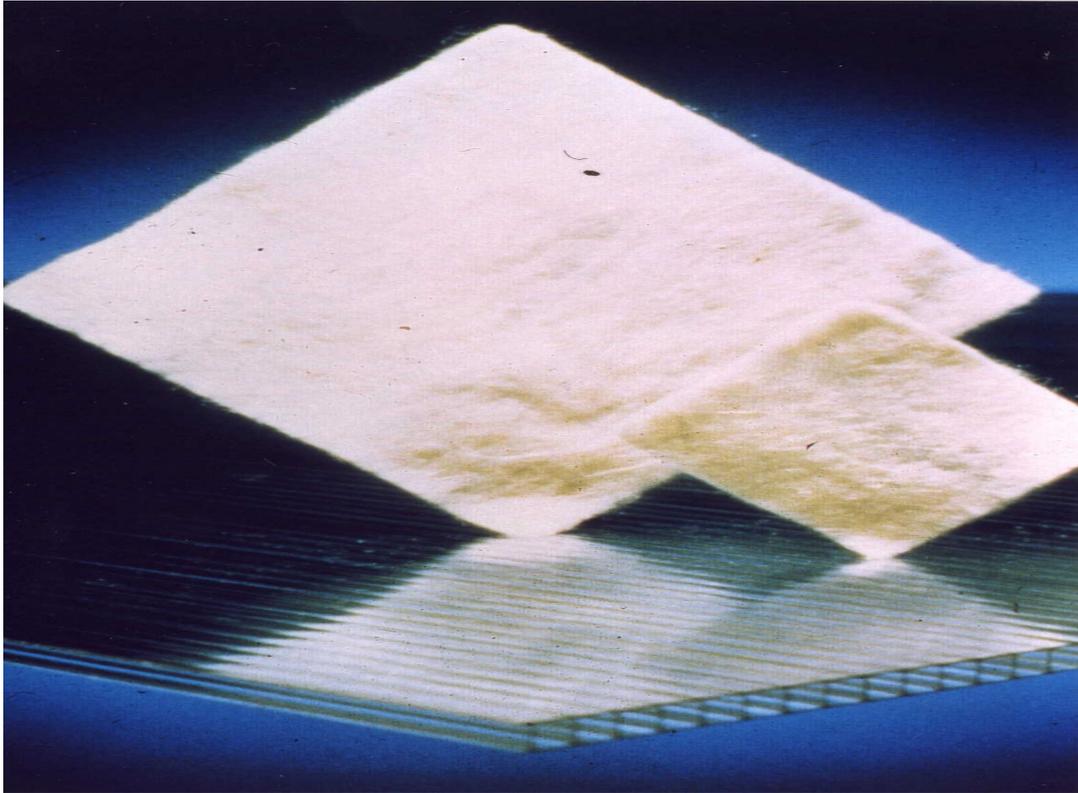
### **5.2.1. Trägermaterial HYAFF 11®**

Viele Biomaterialien eignen sich prinzipiell für Tissue Engineering von Knorpel. Jedoch unterscheiden sie sich in Bezug auf Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit, Konsistenz, strukturelle Eigenschaften und Sterilisierbarkeit.

HYAFF 11® (Fidia, Italien) (Abb. 3) wird auf der Basis von Hyaluronsäure hergestellt, die aus Hahnenkämmen gewonnen wird. Für die Verwendung als Zellträger, in den später die vermehrten Chondrozyten eingebracht werden, wird das Biomaterial chemisch modifiziert: Eine Veresterung freier Carboxylgruppen mit Benzylalkohol führt zu einer Erhöhung der hydrophoben Eigenschaften des Materials, wodurch man Fasern mit einem Durchmesser von 20 µm herstellen kann (Abb. 4). Das aus ungewebten Fasern bestehende Material ist bioresorbierbar und absolut gewebeverträglich. Zur Sterilisation werden Gamma-Strahlen eingesetzt.

Der Zellträger Hyaff 11® in Form einer Membran findet sich bereits im klinischen Einsatz für autologe Keratinozytentransplantationen (Andreassi et al., 1991, Donati et. al., 1995)

Da Hyaluronsäure auch im nativen Knorpel vorkommt, könnte durch die Verwendung eine Zellträgers aus diesem Material auch die Kultivation von Knorpelzellen und dadurch die Knorpelneubildung gefördert werden (Aigner et al., 1998).



**Abb. 3:** Makroskopisches Bild von HYAFF 11®



**Abb. 4:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von HYAFF 11® in Form eines nicht gewobenen Netzes

### 5.2.2. Zellisolation

Nach der Explantation wurden die Knorpelstückchen bis zur Zellisolierung in Dulbecco`s Medium (Biochrom, D- Berlin) versetzt mit 10% FCS (Biochrom, D- Berlin) und 20 mg/l Gentamicin (Refobacin® , Merk, D- Darmstadt) aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen wurde die gereinigte Knorpelbiopsie mit dem Skalpell zerkleinert und ca. 16 Stunden unter Rühren bei 37°C im CO<sub>2</sub> - Inkubationsschrank enzymatisch verdaut. Die Enzymlyösung setzt sich zusammen aus Dulbeccos Medium (Biochrom, D- Berlin), DNase II 0,12 mg/ml (Paesel, D- Frankfurt), Hyaluronidase 0,08 mg/ml (Sigma,D-Deisenhofen) und Kollagenase Typ CLS II 16 mg/ml (Biochrom, D-Berlin).

### 5.2.3. Monolayerkultur und Zellvermehrung

Nach dem enzymatischen Abbau der perizellulären Matrix wurden die isolierten Chondrozyten zur Bestimmung von Vitalität und Zellzahl mit der Trypanblaumethode ausgezählt. Bei dieser Methode kann das Trypanblau in geschädigte oder avitale Zellen gelangen und färbt Zellkern und Zytoplasma blau, wohingegen vitale Zellen das Trypanblau nicht aufnehmen und unter dem Mikroskop weiß erscheinen. Hierfür wurde eine Trypanblaulösung (Fluka AG, D- Neu- Ulm) mit 1,8% NaCl (Apotheke Klinikum Großhadern, D- München) im Verhältnis 1 : 2 vermischt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung mit der Zellsuspension 1 : 2 vermischt und in eine Neubauer Zählkammer eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Gesamtzellzahl (ungefärbte Zellen + blau gefärbte Zellen) sowie der Anteil vitaler Zellen (ungefärbte Zellen/Gesamtzellzahl) bestimmt werden. Ungefähr 200000 bis 400000 Zellen wurden pro Biopsie isoliert.

Die isolierten Chondrozyten wurden anschließend in einer Konzentration von 30000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Kulturflaschen (Becton Dickinson, D- Heidelberg) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Nach dem Anheften der Zellen wurde das Nährmedium Dulbecco`s Medium mit Zusatz von 4,5 g/l D- Glucose, 1,028 g/l Glutamin, 3,7g/l NaHCO<sub>3</sub>, 40 mg/l Gentamicin (Refobacin®, Merck, D- Darmstadt) und 10% FCS (Biochrom, D- Berlin) zweimal pro Woche gewechselt. Bei Konfluenz werden die Zellen nach dreimaliger

Waschung mit phosphatgepufferter Natriumchloridlösung (Apotheke Klinikum Großhadern, D- München) mit Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % (Biochrom, D- Berlin) abgelöst und mit dergleichen Konzentration ausgesät. Die Vermehrungsphase betrug ca. zwei Wochen und beinhaltete im Durchschnitt drei bis fünf Trypsinpassagen.

#### **5.2.4. Zell- Biomaterial- Konstruktherstellung und - kultivation**

Die Zellen aus der Monolayerkultur wurden auf eine Konzentration von  $30 \times 10^6$  Zellen/ml DMEM/fetales Kälberserum (FCS) (Gibco BRL, D- Deisenhofen) eingestellt. Anschließend wurden die 1cm x 1cm x 0,2 cm großen Zellträger aus einen nichtgewobenen veresterten Hyaluronsäurederivat mit einer Mindestkonzentration von  $20 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>3</sup> Trägermaterial beimpft (Hyaff 11® , Fidia, I- Padua) (Aigner et al., 1998, Solchaga et al., 1999). Nach drei Stunden werden die beimpften Konstrukte mit Nährmedium überschichtet und im Brutschrank circa zwei Wochen bis zur Implantation kultiviert. Es wurden drei Zellträger für die Implantation und ein Zellträger für die stationäre Langzeitkultur angefertigt. Der Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag.

Vor Implantation in das autologe Kaninchen wurden die Zellträger dreimal mit PBS ohne Calcium und Magnesium (Apotheke Klinikum Großhadern, D-München) gewaschen.

### **5.3. In vivo Versuchsablauf**

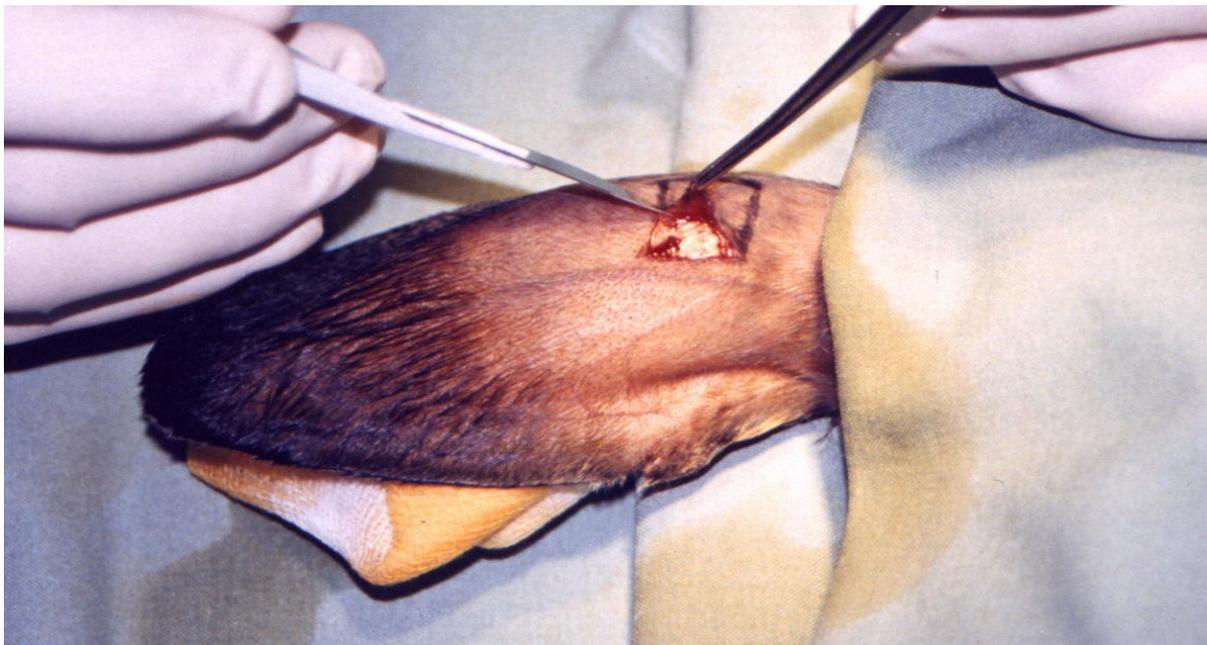
#### **5.3.1. Knorpelentnahme**

Den Kaninchen wurde nach dem Wiegen eine Mischung aus Ketaminhydrochlorid (50mg/kg KGW, Narketan®, Chassot, CH- Lyssach) und Xylazin (4mg/kg KGW, Xylapan®, Vetoquinol AG, CH- Bern- Belp) intramuskulär verabreicht. Im gleichen Mischungsverhältnis erfolgte die Weiterführung der Narkose i.v in einer 2: 10

Verdünnung mit NaCL 0,9% über einen Venenverweilkatheter mit Durchmesser 0,8/25 mm (Venflon® 2, Ohmeda, S- Helsingborg) für die gesamte Operationsdauer. Wahlweise wurde das linke oder rechte Ohr der Kaninchen großflächig geschoren. Nach Desinfektion des Ohres auf beiden Seiten und steriler Abdeckung erfolgte eine quadratförmige Inzision von ca 1 x 1 cm mit geschlossener Basis in Richtung Ohrstamm im proximalen Bereich des Ohres (Abb. 5).

Nach Hebung der Hautschicht mittels stumpfer Präparation und Koagulation oberflächlicher Gefäße wurde nun vorsichtig ein 1 x 1 cm großes Knorpelstückchen mitsamt Perichondrium unter Belassung der Innenhaut des Ohres excidiert (Abb. 6).

Das Perichondrium wurde im Anschluß mittels eines kleinen Skalpells von dem Knorpel entfernt. Der Wundverschluß erfolgt mit einem resorbierbaren Vicrylfaden (Vicryl® 4/ 0, Ethicon, D-Norderstedt) unter fortlaufender Naht (Abb. 7).



**Abb. 5:** Inzision und nach proximal geschlagener Hautlappen am Kaninchenohr



**Abb. 6:** Gehobener Knorpel mit Blick auf die Innenhaut des Ohres



**Abb. 7:** Kaninchenohr nach Wundverschluss

Eine Antibiose mit Enrofloxacin (5mg/kg KGW, Baytril® 2,5%, Provet AG, CH-Lyssach) für drei Tage und eine Analgesie mit Buprenorphin (0,05 mg/kg KGW, Temgesic®, Essex, D- München) für drei Tage bildeten die medikamentöse postoperative Nachsorge.

### **5.3.2. Anlegen des präfabrizierten Lappen und Konstruktimplantation**

Die Anlage des präformierten Lappen und die Knorpelimplantation als zweiter chirurgischer Schritt erfolgte ca. 4 Wochen nach der oben beschriebenen initialen Knorpelentnahme.

#### **5.3.2.1. Anästhesie**

Zur Einleitung der Narkose wurde den Kaninchen nach einer Allgemeinuntersuchung und Wiegen eine Mischung aus Ketaminhydrochlorid (50 mg/kg KGW, Narketan® Chassot Ag, CH- Bern- Belp) und Xylazin (4mg/kg KGW, Xylapan® Vetoniqual Ag, CH- Bern- Belp) intramuskulär gespritzt. Anschließend wurde die Narkose mit dem gleichen Mischungsverhältnis intravenös über einen Venenverweilkatheter (Venflon® 2, Firma Ohmeda, Helsingborg Schweden, Durchmesser 0,8/25 mm) aufrecht erhalten, allerdings in einer 2: 10 Verdünnung mit NaCL 0,9 %. Bei schwer kontrollierbarer Analgesie wurde zusätzlich Fentanyl (0,03-0,05 mg/kg/h KGW, i.v. Fentanyl- Janssen®, Janssen- Cilag, D- Neuss) gespritzt. Zur Kreislaufunterstützung wurden die Kaninchen über die Narkosezeit mit Ringer- Laktat- Lösung (30 ml/kg/h KGW i.v., Ringer Lösung, Delta- Pharma, D- Pfullingen) infundiert und mit Sauerstoff mit einem Flow von ein bis zwei Litern pro Minute versorgt. Sauerstoffsättigung und Puls wurden per Pulssonde an der Zunge kontinuierlich mit einem Pulsoxymeter (Ohmeda ®, USA- Louisville) gemessen. Neben Pulsfrequenz dienten Korneal- und Zwischenzehenreflex zur Beurteilung der Narkosetiefe.

Weiterhin wurden den Kaninchen gegen ein Auskühlen während der langen Operationszeit von ca 5- 6 h eine Heizmatte mit einer Temperatur von ca 35 °Celsius untergelegt und die Augen wurden durch das Auftragen von Augensalbe (Bepanthen® Nasen- und Augensalbe, Hoffmann LaRoche, CH- Grenzach- Whylen) geschützt.

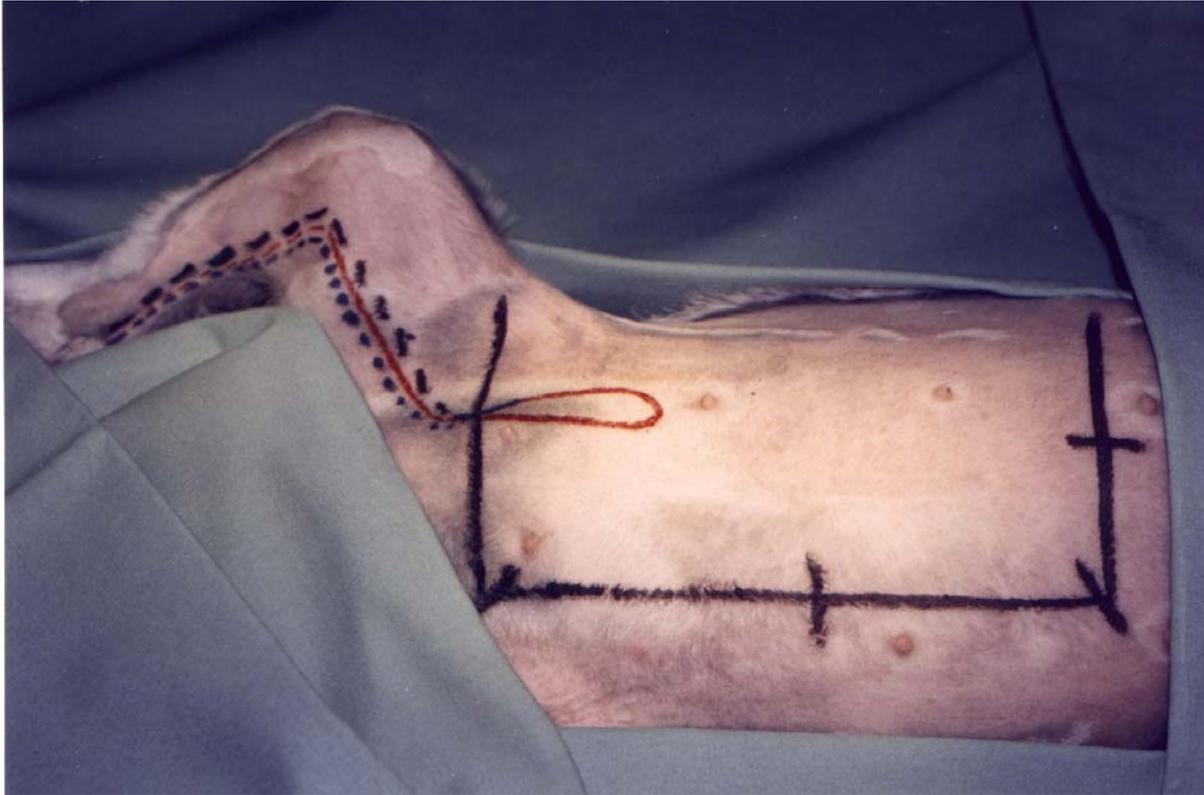
In der Aufwachphase wurden den Kaninchen das Antibiotikum Enrofloxacin (5 mg/ Kg KGW, Baytril® 2,5%, Provet, Ch- Lyssach) und das Analgetikum Buprenorphin (0,05 mg/kg KGW, s.c. Temgesic®, Essex, D- München) subkutan injiziert. Eine

Rotlichtbestrahlung in der Nachschlafphase erfolgte bei längeren Operationszeiten, um einer Hypothermie vorzubeugen.

Als Nachsorge wurden die Antibiose mit Enrofloxacin (5mg/kg KGW, Baytril® 2,5% , Provet, CH- Lyssach)) für fünf Tage nach der Operation einmal täglich, die Analgesie mit Buprenorphin (0,05 mg/kg KGW, Temgesic®, Essex, D- München) für drei Tage postoperativ zweimal täglich weitergeführt. Zusätzlich wurden zweimal täglich 1000 I.E. Heparin (Heparin- Natrium 25.000- Ratiopharm, Ratiopharm GmbH, D- Ulm) verabreicht.

### **5.3.2.2. Operatives Vorgehen**

Die Kaninchen wurden am gesamten Oberbauch bis zwei Zentimeter über den Rippenbogen und an der rechten Schenkelinnenseite geschoren. Nach Fixierung in Rückenlage wurde an der rechten Bauchwand ein rechteckiger Bauchhautlappen mit einem wasserfesten Edding- Stift eingezeichnet. Die mediane ca. 15 cm lange vertikale Linie verlief auf der Mittellinie der Bauchdecke und erstreckte sich kaudal von der Höhe der Kniefalte bis kranial zwei Zentimeter unterhalb des Rippenbogens. Sie wurde ergänzt durch zwei ca. 8 cm lange horizontale Linien in lateraler Richtung am Anfang und Ende der horizontalen Linie (Abb. 8).

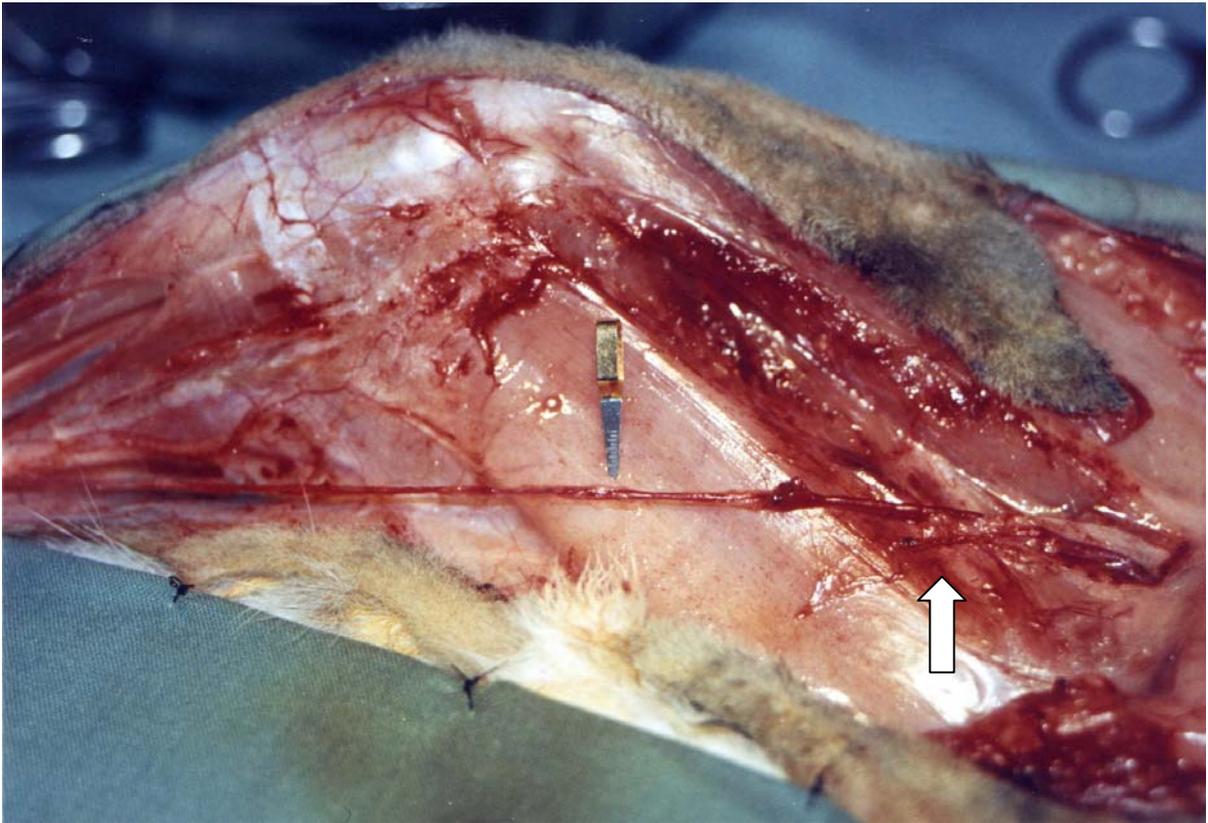


**Abb. 8:** Planung des Bauchhautlappens

Das Operationsfeld wurde desinfiziert und steril abgedeckt. Der Bauchhautlappen wurde an den angezeichneten Linien inzidiert und unter Mitnahme von sämtlichen Hautschichten einschließlich des Panniculus carnosus und Blutstillung mittels Elektrokoagulation gehoben.

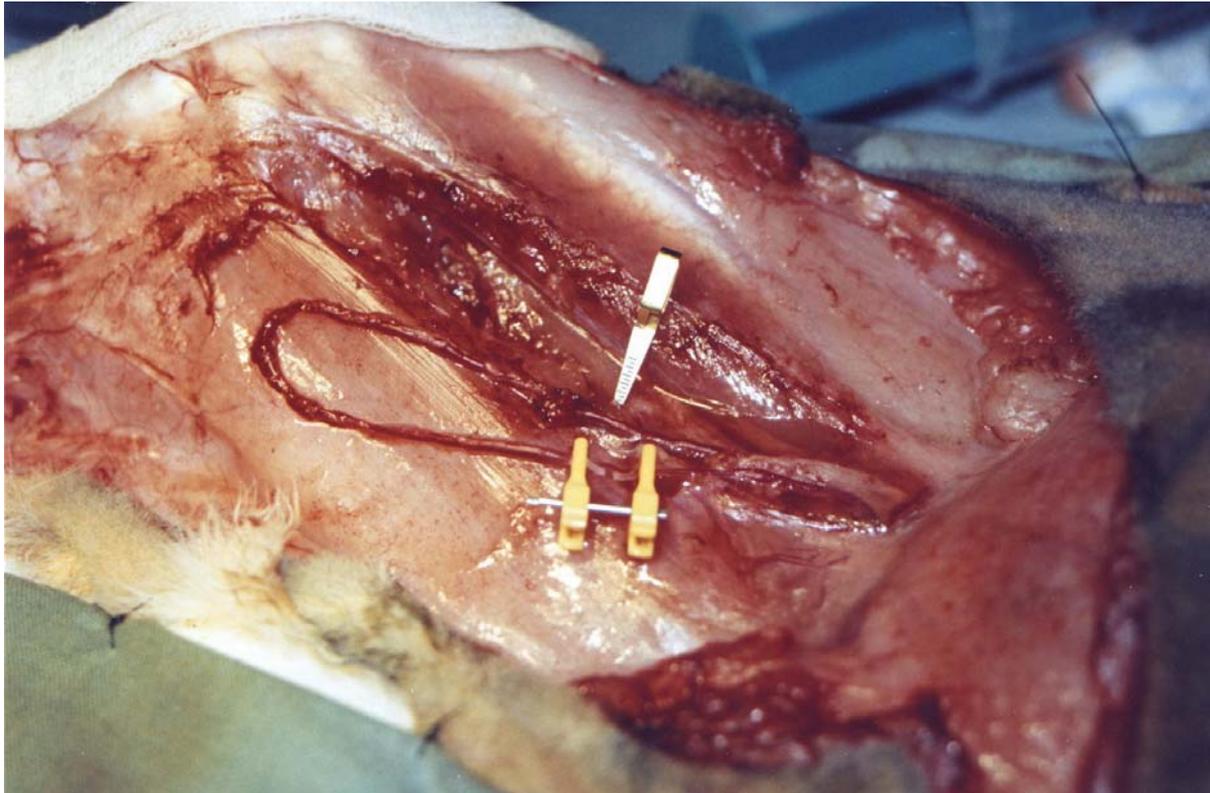
Anschließend erfolgte die Präparation des Gefäßstiels. Der Lappen wurde während dieses Schrittes zurückverlagert und mit Ringer- Laktat- Lösung (Ringer- Lösung, Delta- Pharma, D- Pfullingen) feuchtgehalten. Von der kaudalen Seite des Hautlappens wurde die Haut entlang der medialen Ober- und Unterschenkelinnenseite bis zum Malleolus medialis inzidiert. Die A.- und V. femoralis bzw. die A.- und Vena saphena medialis wurden bis auf die Höhe des Sprunggelenks unter dem OP- Mikroskop (J.K.H Fibermatic®, USA, 4-12-fache Vergrößerung) freipräpariert. Die Seitenäste wurden je nach Größe entweder ligiert oder koaguliert.

Anschließend trennte man die Vene von der Arterie und setzte die Vene bis auf einen proximalen femoralen Gefäßstumpf ab (Abb.9). Zum anatomischen Verlauf der Gefäße des Beines siehe auch Krause 1868 und Barone et. al. 1973.



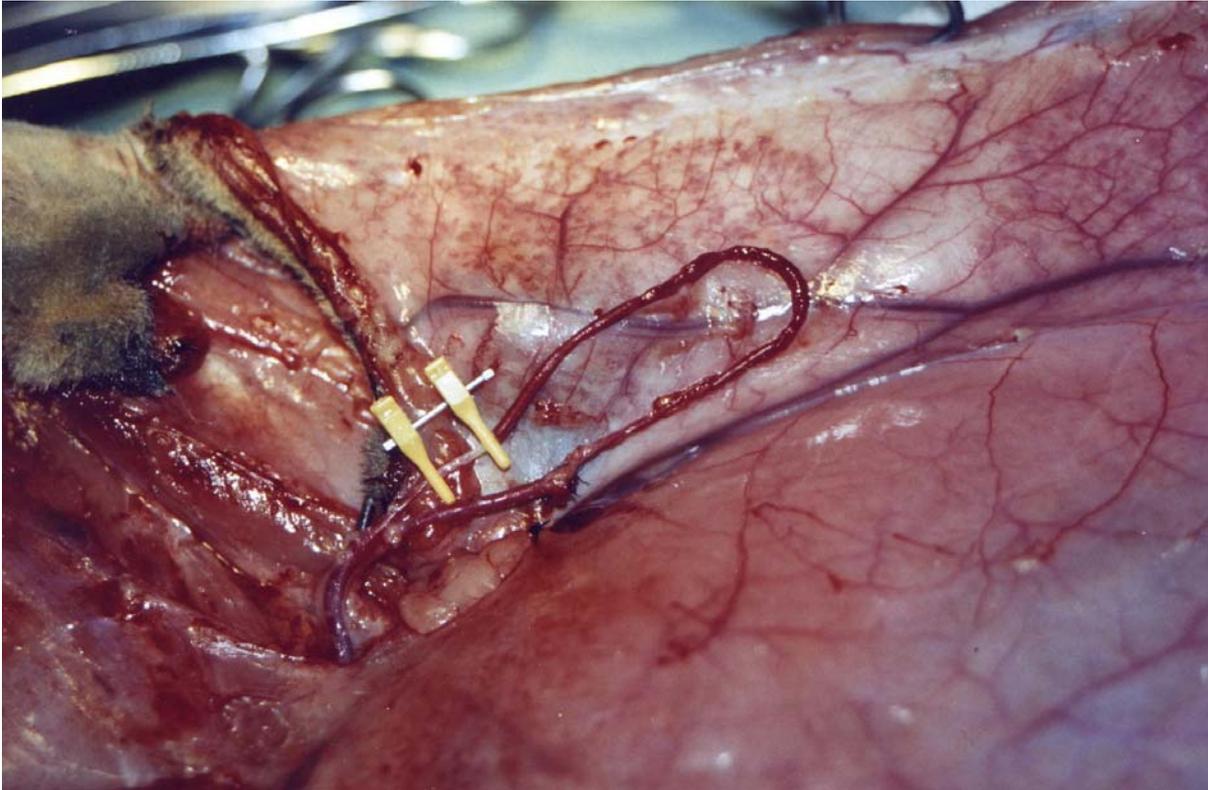
**Abb. 9:** Freipräparierte Arterie (Gefäßklemmchen mit Skalierung) und proximaler Venenstumpf (Pfeil)

Die Arterie wurde distal in Höhe des Sprunggelenks abgesetzt und vorübergehend mit einem Gefäßklemmchen nach Biemer verschlossen. Das distale Ende der Arterie wurde nun an den proximalen Venenstumpf verlagert. Diese beiden Enden wurden mittels einer Doppelklemme adaptiert (Abb. 10) und nach sorgfältiger Abpräparation der Adventitia End-zu-End anastomosiert. Um eine ausreichende Dichtigkeit zu erreichen waren ca. 10 Einzelknopfnähte mit einem monofilem Nylonfaden der Stärke 10/0 (Ethicon®, Firma Ethicon, D- Norderstedt) notwendig. Um eine Thrombusbildung zu vermeiden, erhielten die Kaninchen vor der Mikroanastomose 1000 I.E. Heparin i.v. (Heparin- Natrium 25000- ratiopharm, Ratiopharm, D- Ulm).



**Abb. 10:** Gefäßdoppelklemme mit Stumpf der A. saphena links und V. femoralis rechts vor End- zu- End Anastomose

Der so entstandene schlingenförmige Gefäßstiel („Loop“) wurde unter Vermeidung von Rotation und Distorsion nach kranial umgeschlagen (Abb. 11). Die Fixation auf der viszeralen Seite des Bauchhautlappens erfolgte mit Einzelknopfnähten (Ethilon® 8/0, Ethicon, D-Norderstedt) durch periadventitielles Bindegewebe und erfolgte so, daß die Anastomose spannungsfrei am Lappenrand zu liegen kam.



**Abb. 11:** Gefäßstiel nach Anastomose, nach kranial umgeschlagen unter die Bauchhaut

Zum weiteren Schutz der Anastomose wurde ein kleines Muskelstückchen aus dem M. adductor des geöffneten Beines entnommen und um die Anastomose gehüllt. Der gesamte Gefäßstiel wurde mit einer Faszie bedeckt, entnommen aus der kontralateralen Bauchwandseite. Sämtliche Operationsschritte, die den Gefäßstiel betrafen, wurden wie oben schon erwähnt unter einem Mikroskop unter vier- bis zwölfacher Vergrößerung vorgenommen.

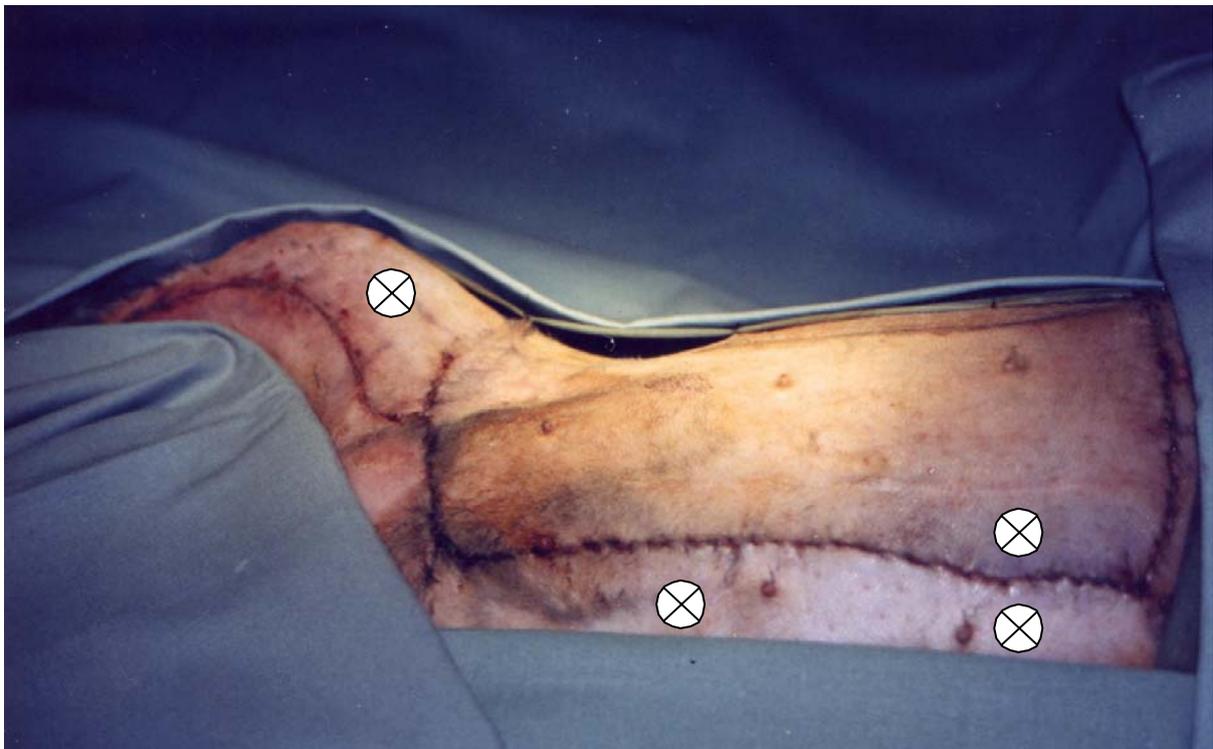
Bevor der Wundverschluß erfolgte, wurden die drei in vitro gezüchteten Knorpelkonstrukte intramuskulär in den M. rectus femoris, subkutan in den kranialen lateralen Teil des präfabrizierten Lappen und subkutan in die laterale Bauchwand implantiert.

Zur intramuskulären Implantation wurde der Muskel rectus femoris des rechten Beines auf einer Länge von ca 1- 1,5 cm inzidiert und anschließend eine ca 1 x 1 cm große Tasche durch Spreizen der Gewebescherre geschaffen. Nach Implantation des Knorpelkonstruktes in Faserrichtung des Muskels wurde die Muskeltasche zur Fixierung und zur besseren Lagebestimmung bei Explantation mit zwei Einzelknopfnähten mit nicht resorbierbaren Ethilonfäden (Ethilon® 4/0, Ethicon, D-

Norderstedt) verschlossen. Bei der subkutanen Implantation der Konstrukte in den lateralen proximalen linken Bereich des präformierten Lappens und in die laterale proximale linke Bauchwand wurde ähnlich der intramuskulären Implantation eine Tasche geschaffen, in die Konstrukte unter Sicht appliziert wurden. Auch hier erfolgt der Verschluss der Tasche mit nichtresorbierbaren Ethilonfäden (Ethilon® 4/0, Ethicon, D- Norderstedt).

Im Anschluß erfolgte die subkutane Implantation der Kontrolle in Form eines nicht mit Chondrozyten besiedelten Leervlieses an der lateralen distalen linken Bauchwand. Zum Ende erfolgte der Wundverschluss: Mit fortlaufender Naht wurden sowohl subkutanen Schichten mit resorbierbaren Vicrylfäden (Vicryl® 4/0, Ethicon, D- Norderstedt) als auch die oberen Schichten mit nichtresorbierbaren Ethilonfäden (Ethilon® 3/0 , Ethicon, D-Norderstedt) verschlossen.

Am Bein erfolgte eine Intrakutannaht mit nichtresorbierbaren Fäden (Ethilon® 3/0 , Ethicon, D-Norderstedt), um einem Aufbeißen der Naht durch das Tier vorzubeugen (Abb. 12).



**Abb. 12:** Wundverschluss und Implantationsorte (Markierung)

Nach Wundverschluss wurde ein Sprühverband und eine Schlauchverband mit Löchern für Vorder- und Hinterläufe (Lohmann® tg- grip, 12 cm, Lohmann-

Therapie- Systeme, D- Andernach) angelegt. Dieser Schlauchverband schützte in der Art eines „Pullovers“ die Bauchwunde und wärmte das Tier zugleich

### **5.3.3. Knorpelimplantation und – nachbereitung**

Die Kaninchen wurden 6 oder 12 Wochen nach der Knorpelimplantation mit Pentobarbital (Narkoren® 160mg/kg KGW i.v., Merial, D-Hallbergmoos) euthanasiert. Für die Auswertung der neofabrizierten Lappen wurde der Gefäßstiel kaudal der Lappen freigelegt und die Bauchhautlappen dem ursprünglichen Inzisionsverlauf nach umschnitten. Es folgte die selektive Mikroangiografie mit Bariumsulfat. Die Konstrukte wurden nach der selektiven Angiografie vorsichtig explantiert und zur weiteren Bearbeitung nach fotografischer Dokumentation in O.C.T. Compound (Tissue Tek®, D- Hallstadt) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Anschließend wurden 7 µm dicke Schnitte mit einem Kryostat (Kryostat Typ 2800, Reichert- Jung, D- Nussloch) angefertigt und bis zur histochemischen und immunhistochemischen Färbung bei –20 °C aufbewahrt.

## **5.4. Auswertung**

### **5.4.1. Selektive Mikroangiografie**

Nach Ablauf von 6 oder 12 Wochen wurden die Bauchhautlappen unter Allgemeinnarkose (siehe 5.3.2.1.) an allen Seiten der ursprünglichen Inzision umschnitten. Die Präparation des Gefäßstieles im Leistenbereich erfolgte nach Durchtrennung der oberen Hautschichten unter Zuhilfenahme einer Lupenbrille (4-fache Vergrößerung). Arterie und Vene wurden getrennt dargestellt, die Arterie wurde kaudal ligiert. Nach horizontalem Anschneiden der Arterie wurde ein Venenkatheter (0,8 mm Durchmesser, Braun AG, Melsungen) ca. 1 cm in anterograder Richtung in die Arterie eingeführt und mit Vicrylfäden (Vicryl® 4/0, Ethicon, D- Norderstedt) befestigt. Der Gefäßstiel wurde mit einer Spüllösung (25.000 I.E. Heparin+ 500ml Ringer- Laktat- Lösung, Delta- Pharma, D- Pfullingen) für 30 min gespült. Danach

erfolgte eine Durchtrennung der Vene kaudal des Lappenrandes und eine Infusion einer Bariumsulfat- Lösung (Micropaque® flüssig, Guerbet, D- Sulzbach/Taunus), die aus Bariumsulfat und Rheomacrodex® 10% (Rheomacrodex®, Pharmalink, Schweden- Upplands Väsby) im Verhältnis 2: 1 bestand. Durch die Verdünnung sollte eine bessere Viskosität und somit eine verbesserte Kapillargängigkeit erreicht werden. Diese Infusion dauerte ca. 90 min, während der letzten 30 min wurde die Vene mit einem Gefäßklemmchen verschlossen, um so den Rückstau in die Lappengefäße zu erhöhen.

Danach wurden die Tiere mit Pentobarbital (Narkoren ® 160 mg/kg KGW i.v., Merial, D- Hallbergmoos) euthanasiert. Der Lappen wurde in toto inklusive Katheter gehoben und auf einer Papierfolie mit Klebeband befestigt. Es erfolgten zwei Röntgenaufnahmen im posterior- anterior Strahlengang mit 18 und 20 KV bei 30 sec. Belichtungszeit. Die Aufnahmen wurden entwickelt im automatischen Entwickler.

## **5.4.2. Histochemie**

### **5.4.2.1. Alcianblaufärbung**

Der Nachweis saurer Mucopolysaccharide wurde mit Alcianblaufärbung erbracht. Nach Fixierung in gepuffertem Formol (Merck, D- Darmstadt) für 15 Minuten wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült und mit Alcianblaulösung (Chroma-Gesellschaft, D-Köngen) für 60 Minuten gefärbt. Nach nochmaligem Spülen mit Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Kernechtrot- Aluminiumsulfat (Chroma- Gesellschaft, D- Köngen) für 15 Minuten. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol (Merck, D- Darmstadt) entwässert und in Eukitt (Kindler, D- Freiburg) eingebettet.

### **5.4.2.2. Toluidinblaufärbung**

Zum Nachweis von Metachromasie durch saure Mucopolysaccharide wurde die Toluidinblaufärbung verwendet. Die Schnitte wurden in gepuffertem Formol (Merck, D- Darmstadt) für 15 Minuten fixiert. Nach Spülung mit Aqua dest. erfolgte die

Färbung in einer Lösung aus 0,03% Toluidin (Merck, D- Darmstadt) in 30%igem Äthanol für 60 min. In aufsteigender Alkoholreihe und Xylol (Merck, D-Darmstadt) wurden die Schnitte entwässert und anschließend mit Eukitt (Kindler, D-Freiburg) eingebettet.

### **5.4.2.3. Azanfärbung**

Zur Darstellung von synthetisierten Kollagenfasern wurden die Schnitte 15 Minuten in Carnoyscher Lösung bei pH von 2,9 (6 Teile 96% Alkohol in H<sub>2</sub>O, 3 Teile Chloroform, 1 Teil 96 - 99%ige Essigsäure) fixiert. Die Färbung erfolgt mit AZAN- Kombination (Chroma- Gesellschaft, NL- Köngen) für 20 Minuten und anschließender Differenzierung mit 94%igem Propylalkohol (Merck, D- Darmstadt) für 10 Sekunden. Nach Entwässerung in absolutem Alkohol erfolgte die Einbettung in Eukitt (Kindler, D- Freiburg).

## **5.4.3. Immunhistochemie**

### **5.4.3.1. Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase (APAAP)**

Zum Nachweis von Kollagen Typ II wurden die Gefrierschnitte 10 Minuten in Aceton fixiert und anschließend in TBS 5 Minuten gespült. Es folgte eine 20 minütige Inkubation mit Schweineserum/PBS (1:5) (Sigma, D-München) um hydrophobe Interaktionen zu blockieren. Nach Abklopfen dieser Lösung erfolgte eine 60 minütige Inkubation mit monoklonalem Maus- Anti- Human Kollagen Typ II 1:100 (II-II 6B3 Linsenmayer, Hybridoma Bank, USA). Anschließend wird mit Maus Ig 1:50 für 30 Minuten (Dako, DK- Glostrup) und mit APAAP 1:100 für 30 Minuten (Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase, Maus, Dako, DK- Glostrup) inkubiert. Nach dem Waschen in TBS werden die beiden letzten Inkubationen mit jeweils 10 Minuten Inkubationszeit wiederholt. Zum Sichtbarmachen der Antikörperkomplexe wurde die Neufuchsin Methode (Cordell et al.,1984) angewandt.

#### **5.4.3.2. Peroxidase- anti- Peroxidase Immunhistochemie**

Zum Nachweis von Kollagen Typ I und Chondroitinsulfat wurde die PAP- Methode angewandt:

Wie bei der APAAP- Methode wurde das Präparat in Aceton fixiert und unspezifische Bindungen durch Schweineserum (1:5 in TBS) blockiert. Nach Abklopfen erfolgte die Inkubation mit Kaninchent- anti- Human- Collagen 1: 100 (Cell Systems, D- St. Katharinen) für 60 Minuten und nach Waschen mit TBS die Inkubation mit Schwein-anti- Kaninchen Peroxidase konjugiert 1:100 (Dako, DK- Glostrup) für 30 Minuten. Nach nochmaligem Waschen mit TBS wurde mit der AEC- Methode für 20 min gefärbt: Es wurden 20 mg 3- Amino- 9-Ethyl- Carbazole (Sigma, D- Deisenhofen) in 5 ml Dimethylsulfoxid (Merck, D- Darmstadt) gelöst und dann 95 ml 0,05 M Natriumacetat (Merck, D- Darmstadt) zugegeben.

Die Gegenfärbung zur Darstellung der Morphologie erfolgte mit saurer Hämalaunlösung für 5 min (Reagenz nach P. Mayer/Romeis § 648, Apotheke Klinikum Großhadern).

Die Schnitte wurden mit Leitungswasser abgewaschen und mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, D- Darmstadt) eingedeckt.

#### **5.5.3. Vitalitätstest auf Fluoreszenzbasis**

Chondrozyten können in Monolayerkultur oder in dreidimensionaler Anordnung nach Anfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Ethidiumhomodimer und Calcein AM fluoreszenzmikroskopisch auf ihre Vitalität untersucht werden.

Beim Lebend- Tod- Test (Molecular Probes, NL- Leiden) wurde der nativ beimpfte Zellträger dreimal mit PBS gewaschen und 40 Minuten im Dunkeln mit 2  $\mu$ M Calcein AM und 4  $\mu$ M Ethidiumhomodimerlösung inkubiert. Anschließend wird wieder mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet: Lebende Zellen haben das nicht fluoreszierende zellpermeable Calcein AM mittels intrazellulärer Esteraseaktivität in das fluoreszierende Calcein umgewandelt und erscheinen in einem intensiven Grün bei 450 nm. Tote Zellen erscheinen durch das Ethidiumhomodimer, das deren beschädigte Zellmembranen passiert und an die Nukleinsäuren bindet, bei 590 nm in einem breiten Rot.

## **6. Ergebnisse**

### **6.1. Komplikationen und Ausfallquote**

Im Rahmen des Projektes wurden zwölf Kaninchen operiert. Zwei Kaninchen starben in dem Zeitraum nach Knorpelentnahme aus dem Ohr und Implantation an einem viralen Infekt. Ein weiteres Kaninchen starb postoperativ durch Nachblutung nach dem Anlegen des präfabrizierten Lappens und Implantation der gezüchteten Knorpelkonstrukte. Von den überlebenden Kaninchen wurden fünf Kaninchen nach sechs Wochen und vier Kaninchen nach zwölf Wochen geopfert.

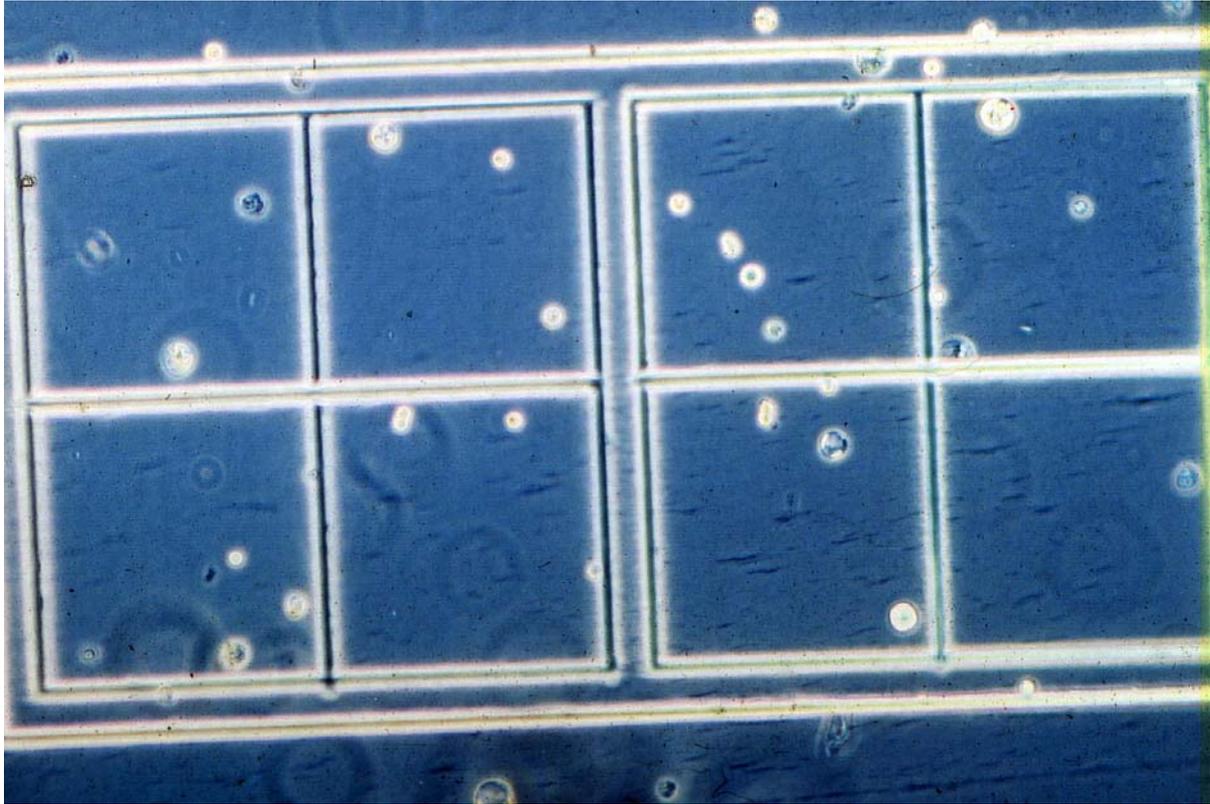
Bei einem weiteren Kaninchen konnte die angiografische Darstellung der Gefäße trotz vitalem Lappen nicht erfolgen, da bei diesem Tier der Gefäßstiel thrombosierte. Diese Thrombosierung war auf eine lokale Infektreaktion mit Serombildung zurückzuführen.

Der postoperative Verlauf war bei den oben genannten Kaninchen ohne Probleme. Von zwei Kaninchen wurde die Beinnaht aufgrund von leichter Erreichbarkeit aufgebissen und musste revidiert werden.

### **6.2. In vitro Ergebnisse**

#### **6.2.1. Chondrozytengewinnung und - vitalität**

Nach der Entnahme aus dem Ohr wurden die ca 1 cm<sup>2</sup> großen Knorpelstückchen sorgfältig von Bindegewebe und Blutresten befreit. Die Knorpelstücke wurden mit einem Skalpell zerkleinert. Es folgte der Enzymverdau (EV) mit Isolierung der Chondrozyten und anschließend die lichtmikroskopische Zählung und Vitalitätsbestimmung der Chondrozyten mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer und Trypanblau- Anfärbung (Aigner et al., 1998). Avitale oder geschädigte Zellen zeigten sich blau, wohingegen vitale Zellen weiß erschienen (Abb. 13).

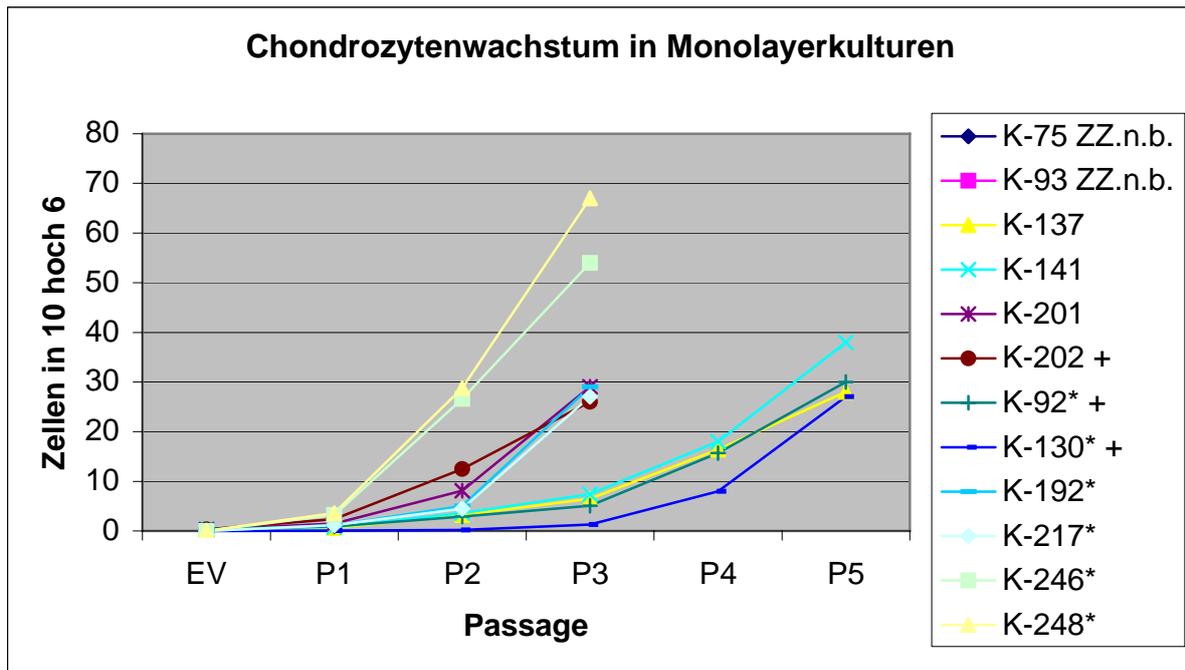


**Abb. 13:** Trypanblaufärbung der isolierten Chondrozyten in der Zählkammer

Im Mittelwert konnten so etwa  $0,161 \times 10^6$  vitale Knorpelzellen pro Gramm Knorpelgewebe nach Enzymverdau (EV) isoliert werden.

### 5.2.2. Monolayerkulturen

Die aus der Isolation gewonnenen Chondrozyten wurden in die Monolayerkulturen überführt und im Mittel über 3,6 Passagen vermehrt. Nach 3 Passagen war die Zellzahl im Mittelwert bei  $25,32 \times 10^6$  Zellen (Abb.14 und Tabelle 1).



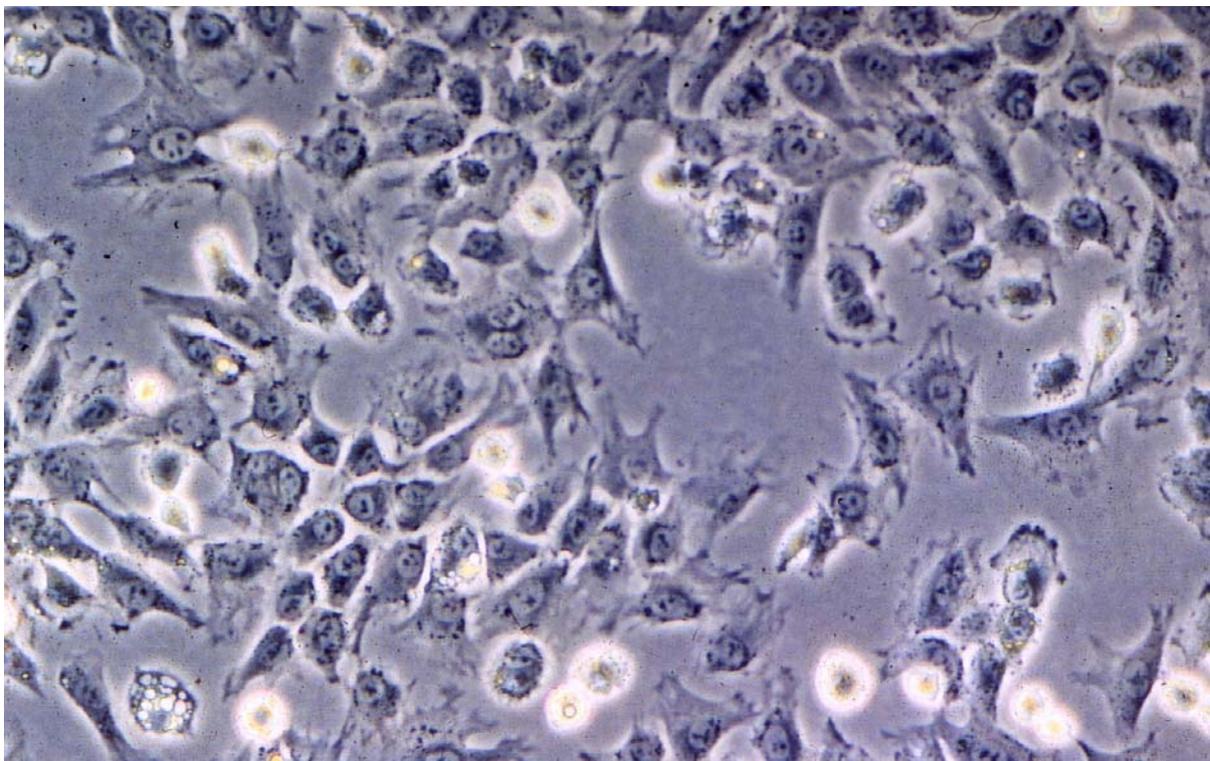
**Abb. 14:** Zellvermehrung in Monolayerkultur: Kaninchen nach 12 Wochen geopfert mit \* , Kaninchen im Versuchsverlauf verstorben mit + versehen

Kaninchen Nr. / Passagen	EV	P1	P2	P3	P4	P5
K- 75 ZZ.n.b.						
K- 93 ZZ.n.b.						
K- 137	0,22	0,6	3,2	6,5	16,4	28
K- 141	0,41	0,8	3,6	7,4	18	38
K- 201	0,24	1,46	8,1	29		
K- 202 +	0,29	2,4	12,5	26		
K- 92* +	0,36	0,9	2,9	5,1	15,7	30
K-130* +	0,012	0,05	0,2	1,3	8	27
K- 192*	0,023	1,14	5	29		
K- 217*	0,019	1,14	4,5	27		
K- 246*	0,015	3,2	26,6	54		
K- 248*	0,02	3,6	28,8	67		
Mittelwert	0,1609	1,529	9,54	25,23		

**Tab 1.:** Zellzahl der isolierten Chondrozyten  $\times 10^6$  nach Enzymverdau (EV) sowie Amplifikation der isolierten Chondrozyten über 3- 5 Passagen mit Mittelwerten

Bei Kaninchen Nr. 75 und Nr. 93 wurden sowohl bei Chondrozytenisolierung und bei Vermehrung der Chondrozyten in der Monolayerkultur keine Zellzahlen eruiert. Die Zellen dieser Kaninchen wurden bis zur 3. Passage vermehrt und dann auf das Trägergerüst umgesiedelt.

Nach relativ kurzer Zeit, spätestens zum Zeitpunkt der 3. Passage zeigten die Zellen das typische Muster der Dedifferenzierung, d.h. sie hatten nicht mehr den runden, knorpelspezifischen Phänotyp, sondern eher einen sternförmigen fibroblastenähnlichen Phänotyp (Abb. 15).



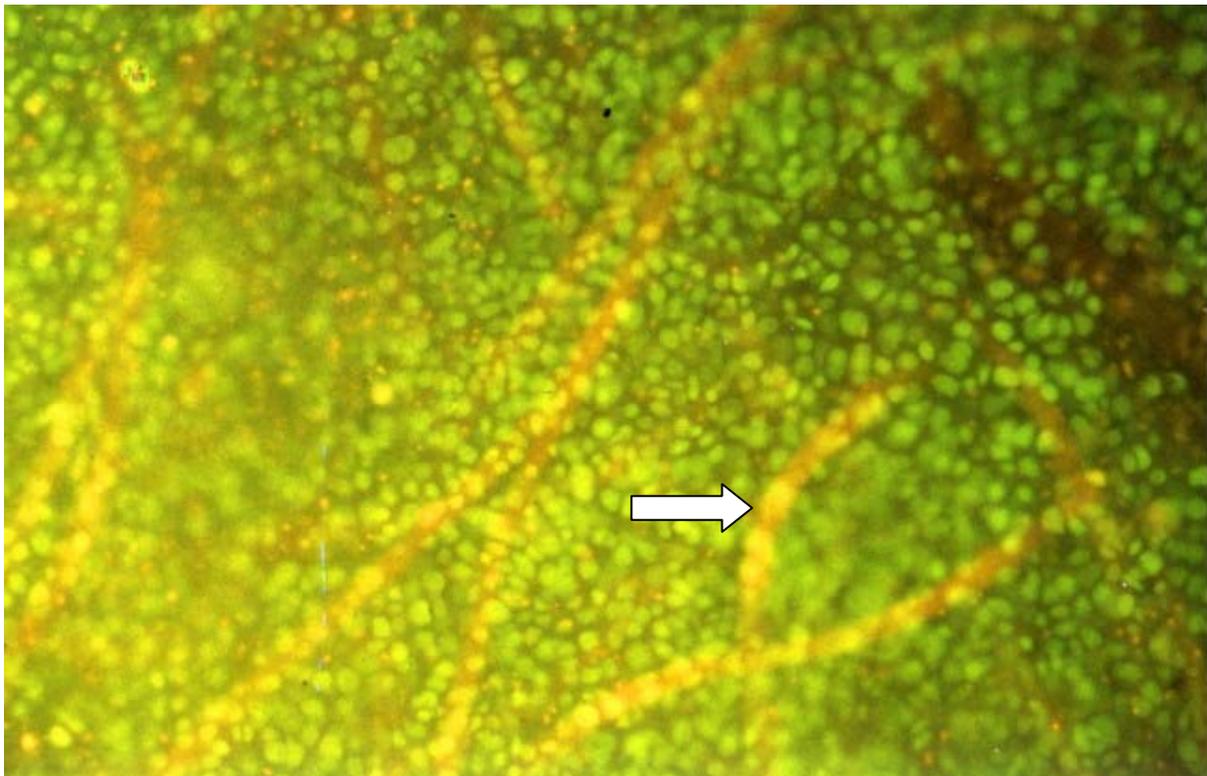
**Abb. 15:** Während P1 fünf Tage nach Zellisolation

### 6.2.3. Besiedelung der Zellträger und Kultivation

Diese Zellen aus den Monolayerkulturen wurden konsequent auf 1 cm<sup>2</sup> große Proben von dem nicht- gewobenen veresterten Hyaluronsäurederivat in einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  Zellen/pro Kubikzentimeter des Trägergerüsts aufgebracht. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten die Reexpression von knorpel-

spezifischem Kollagen Typ II in den Zellen, die auf das Biomaterial aufgebracht wurden.

Die Adhäsion der Zellen an das Biomaterial war gut. Die Zellen verteilten sich weitgehend einheitlich in der dreidimensionalen Kultur. Eine gute Vitalität der Zellen zum Zeitpunkt der Implantation zeigten Ergebnisse im Lebend- Tot- Test (Abb 18.) .



**Abb. 16:** Live- Dead –Test: Konstrukt vor Implantation in Kaninchen: Lebende Zellen grün, („tote“) Fasern des Trägermaterials rot (Pfeil)

4 Konstrukte von 1 cm<sup>2</sup> wurden gezüchtet und 3 Konstrukte nach ca 2-3 Wochen- vitro Kultur implantiert. Das verbleibende Konstrukt wurde in eine stationäre Langzeitkultur eingebracht.

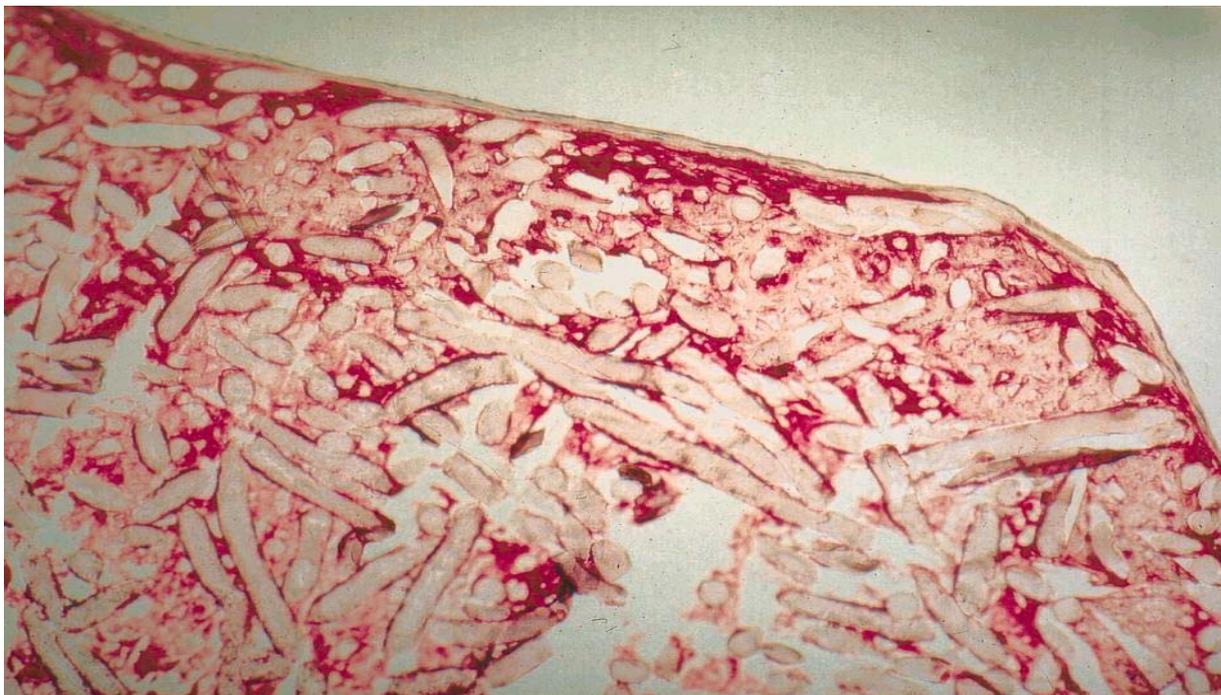
#### **6.2.4. Zell- Biomaterial- Konstrukt in stationärer Kultur**

Makroskopisch zeigten sich sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen in stationärer Kultur die Konstrukte sehr gut in der Form erhalten. Sie hatten einen knorpelartigen Aspekt und zeigten sich stabil (Abb. 17).

In den histochemischen Schnitten zeigten sich neben dem Nachweis von Kollagen Typ II in weiten Teilen der Areale auch der Nachweis von Proteoglykanen (Abb. 18). Es fanden sich Faserreste des veresterten Hyaluronsäurederivates in allen Präparaten.



**Abb. 17:** Zell- Biomaterial- Konstrukt nach 12 Wochen in stationärer Kultur makroskopisch



**Abb. 18:** Immunhistochemischer Schnitt: Zellbiomaterialkonstrukt nach 12 Wochen in stationärer Kultur (APAAP- Färbung), rot: Kollagen Typ II

## 6.3. In vivo Ergebnisse

### 6.3.1. Ergebnisse nach 6 und 12 Wochen Implantationszeit

#### 6.3.1.1. Makroskopischer Aspekt allgemein

Aus makroskopischer Sicht waren die Konstrukte sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen Implantationszeit weitgehend gut erhalten in der Form, wobei die in den präformierten Bauchhautlappen und intramuskulär implantierten Konstrukte tendenziell stärker geschrumpft oder deformiert waren als die subkutan implantierten Konstrukte (Abb. 19)

Die Konstrukte waren vom Aspekt her knorpelartig. Sie waren mechanisch stabil mit einer starken Konsistenz, welcher Knorpel ähnelte. Bei zwei Tieren nach 12 wöchiger Implantationszeit zeigte sich eine eher knöcherne Konsistenz aller Konstrukte.

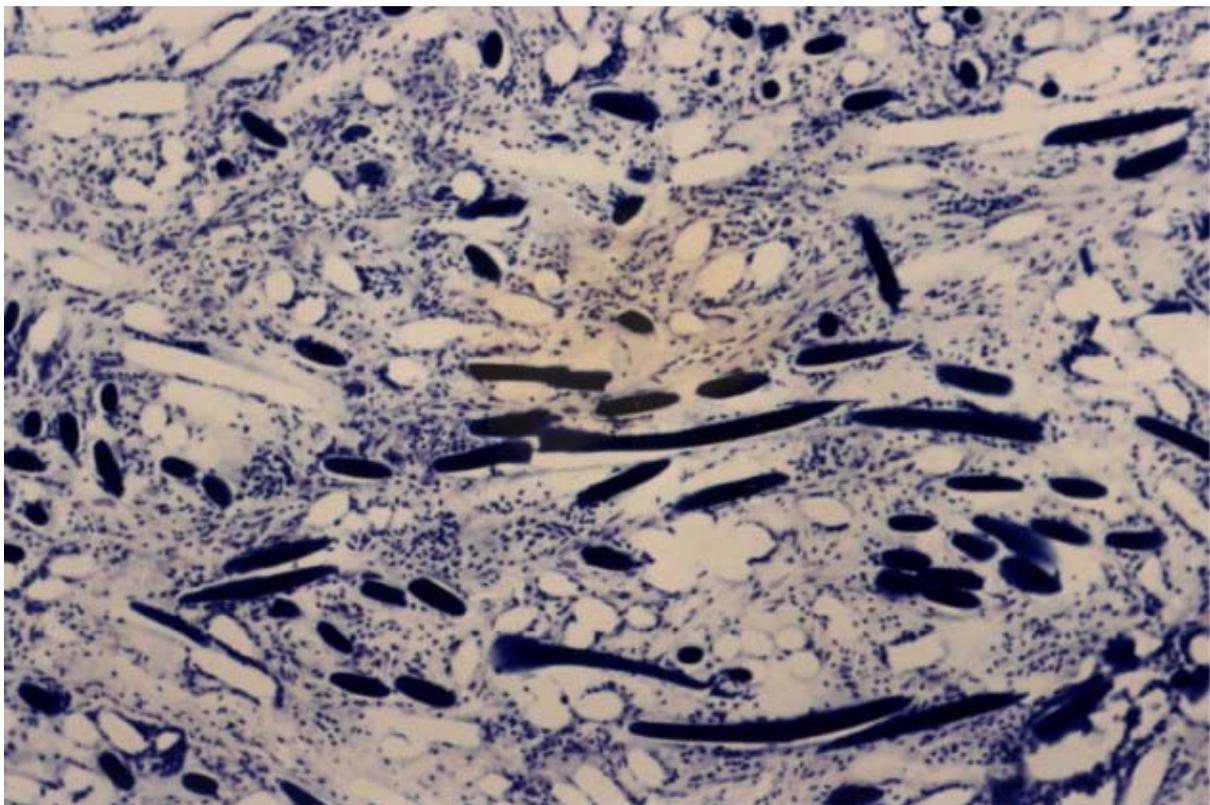
In der Gruppe mit 6 wöchiger Implantationszeit gab es keine größeren Anzeichen von Resorptionsprozessen oder von nekrotischen Arealen in den Implantaten. Bei einem Tier waren nach 12- wöchiger Implantationszeit keine Konstrukte mehr auffindbar.



**Abb. 19:** Unterschiedliche Implantate nach Explantation. Von links nach rechts: Kontrollvlies (Ko), Subkutanes Konstrukt (Sk), Lappenkonstrukt (La), intramuskuläres Konstrukt (Im)

### 6.3.1.2. Intraindividuelle Kontrolle

Der Zellträger bestehend aus einem benzylveresterten Hyaluronsäurederivat wurde als Negativkontrolle ohne Chondrozyten subkutan implantiert. Sowohl nach 6-wöchiger als auch nach 12-wöchiger Implantationszeit war ein Einwandern verschiedener Zelltypen in das Biomaterial erkennbar. Es gab keine Hinweise auf eine Knorpelneogenese oder entzündliche Prozesse. Zwischen den eingewanderten Zellen waren noch vereinzelt Restfasern des Trägermaterials zu finden (Abb. 20).



**Abb. 20:** Kontrollvlies mit eingewanderten Zellen und Restfasern (dunkelblau) nach 6-wöchiger Implantationszeit (Toluidinblaufärbung), Vergrößerung x 200

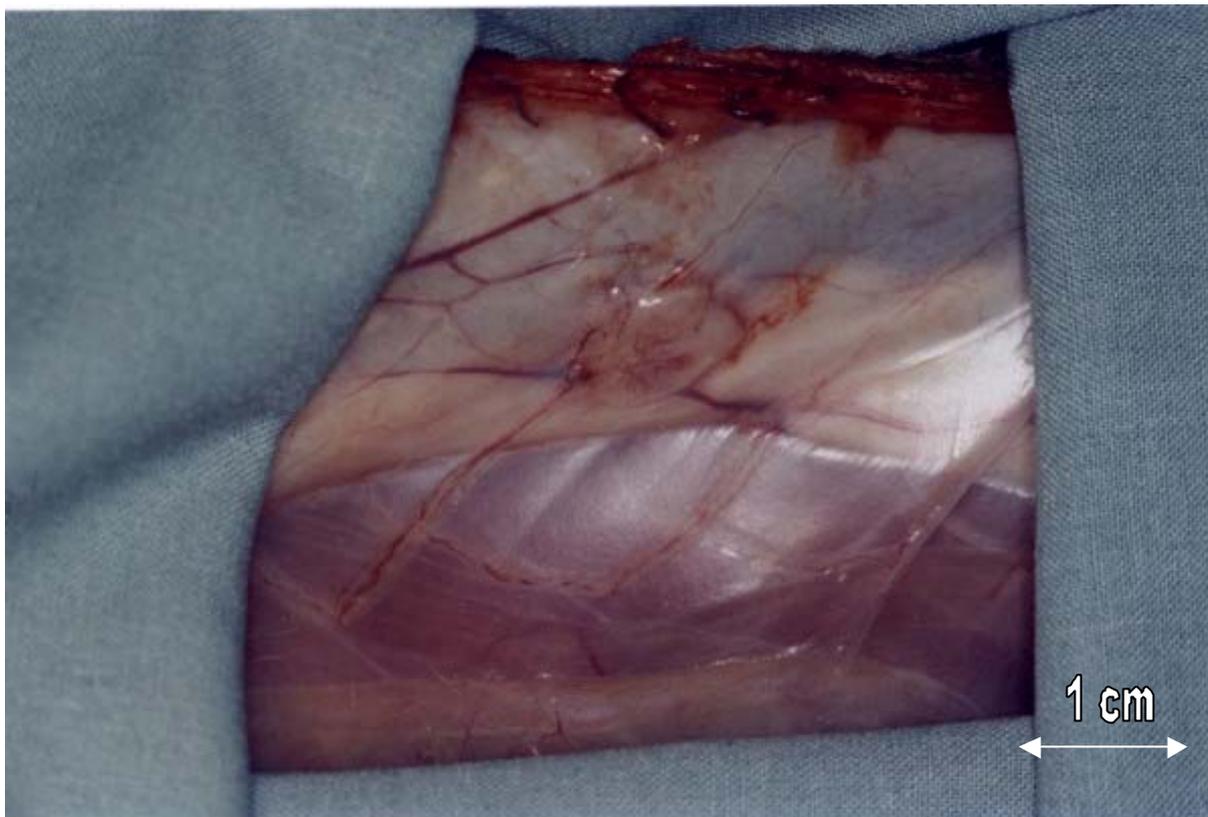
### 6.3.1.3. Subkutane Implantation

Die subkutane Implantation der Konstrukte bedeutete ein gut vaskularisiertes Empfängerbett mit geringem mechanischem Stress.

Die subkutan implantierten Konstrukte imponierten ohne Hinweise auf Resorptionsvorgänge. Sie waren mechanisch stabil, von fester Konsistenz, die

Knorpel ähnelte. Die Konstrukte waren gut erhalten in der Form und von einer bindegewebigen Kapsel und Gefäßen umgeben, die die Konstrukte jedoch nicht invadierten (Abb. 21).

In der Immunhistochemie zeigte sich eine deutliche Neosynthese von knorpelspezifischen Kollagen Typ II in weiten Teilen der Implantate. Der Knorpel war nicht homogen, sondern durchzogen von Restfasern des veresterten Hyaluronsäurederivates und fibrotischen Gewebes (Abb. 22).



**Abb. 21:** Subkutan implantiertes Konstrukt

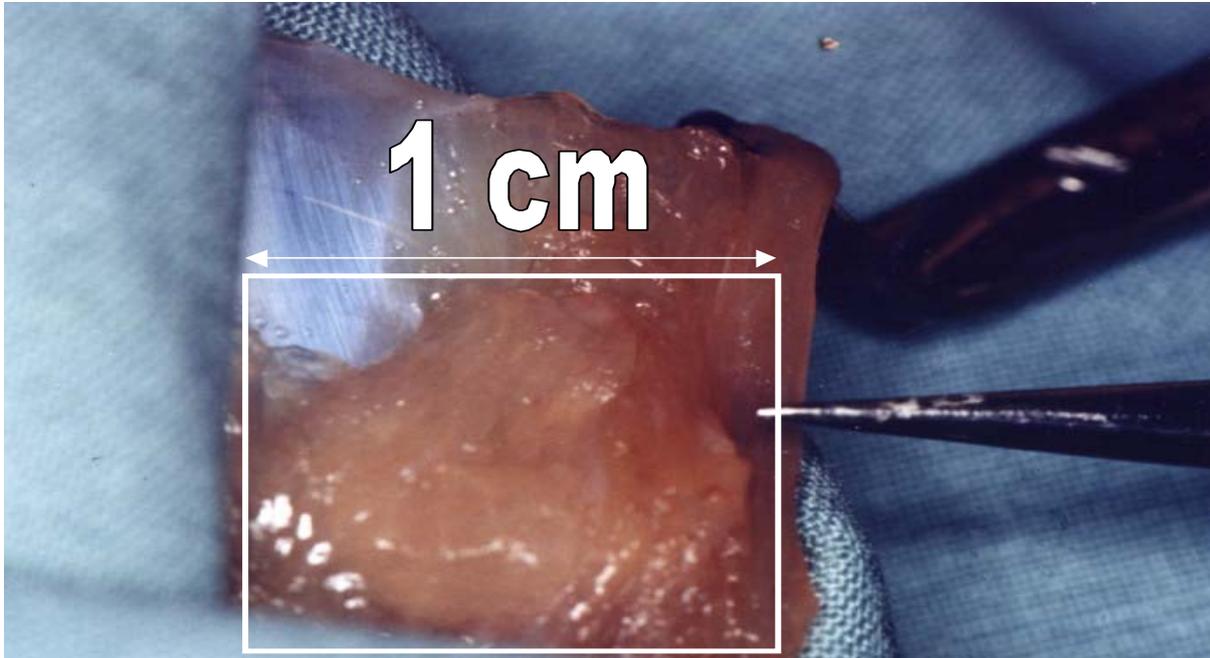


**Abb. 22:** Immunohistochemischer Schnitt: Subkutan implantiertes Konstrukt (APAAP-Färbung), rot: Kollagen Typ II (Pfeil), weißlich: Restfasern des Biomaterials

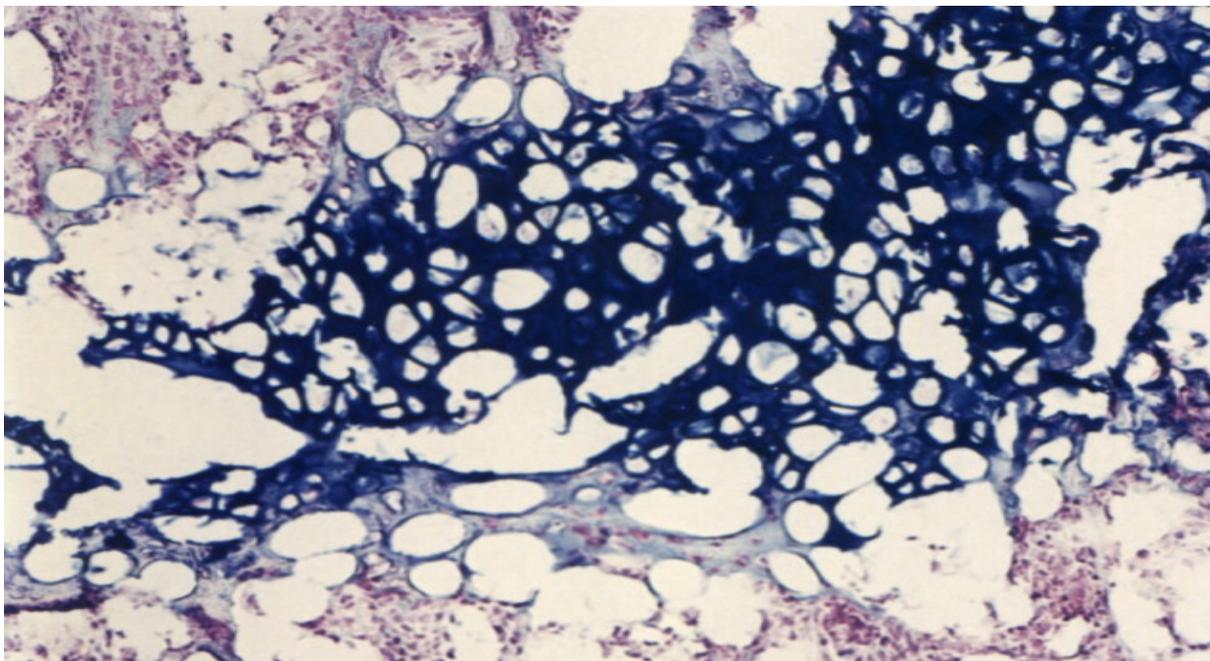
#### 6.3.1.4. Intramuskulärer Implantation

Die intramuskuläre Implantation der gezüchteten Knorpelkonstrukte bedeutete ein sehr gut durchblutetes Empfängerbett mit zusätzlichem mechanischem Stress. Im makroskopischen Bild war das Knorpelgewebe komplett in das umgebende Muskelgewebe eingewachsen (Abb. 23). Es fehlten jegliche Zeichen von Entzündung oder Resorptionsprozessen. Mit einer festen Konsistenz ähnlich den subkutan implantierten Konstrukten zeigten die Konstrukte aber eine mässige Tendenz zur Schrumpfung und Deformierung.

In der Alcian- Färbung zeigte sich in weiten Abschnitten der Implantate die Synthese von Knorpelmatrix sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen Implantationszeit (Abb.24).



**Abb. 23:** Knorpelkonstrukt (weißer Kasten) im M. rectus femoris



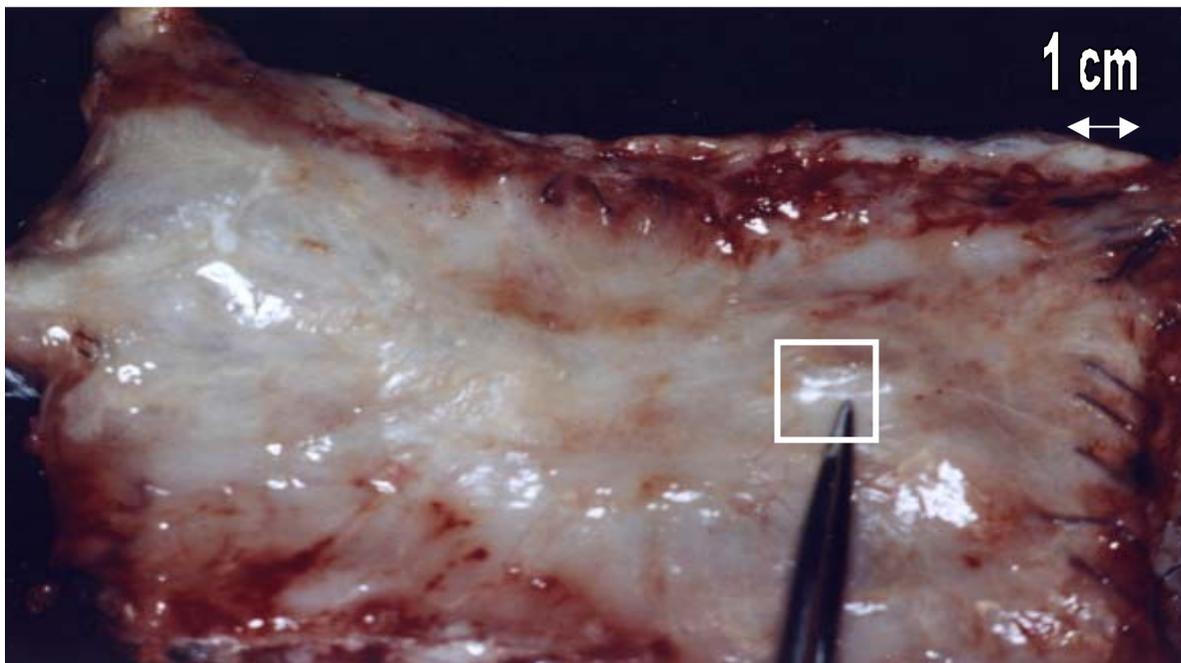
**Abb. 24:** Histochemischer Schnitt: Intramuskulär implantiertes Konstrukt (Alcianblaufärbung), blau: Proteoglykane (Vergrößerung x 400)

### 6.3.1.5. Implantation in einem freien präfabrizierten Bauchhautlappen

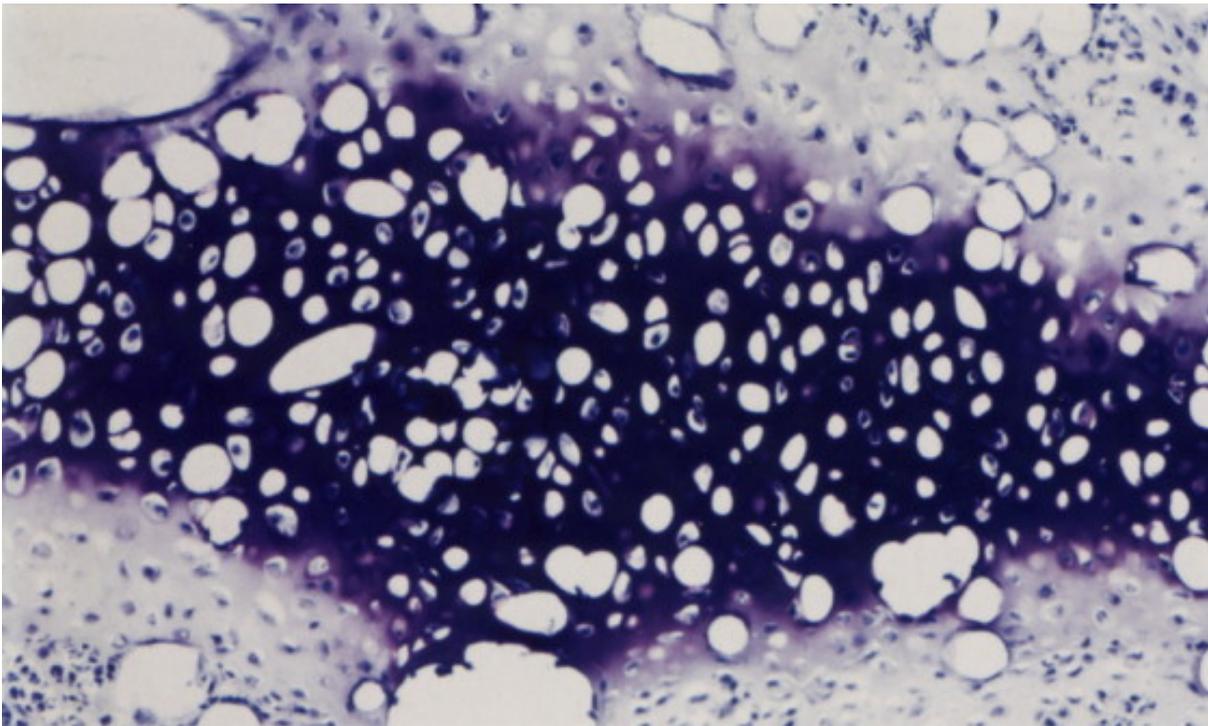
Im ersten Schritt erfolgte die Anlage eines Gefäßstieles („Loops“) unter einen Bauchhautlappen. Innerhalb der nächsten 20 Tage kam es über einen Gefäßanschluß über den Gefäßstiel an das Gefäßnetz des Lappens mit einer daraus resultierenden axialen Versorgung wodurch u.a. eine Transplantation als mikrovaskulärer freier Lappen möglich wird.

In den ersten Wochen mußten die implantierten Konstrukte eine ischämische Situation ertragen. Die Implantate ähnelten in der Konsistenz den subkutan und intramuskulär implantierten Konstrukten. Sie erschienen ebenfalls stabil, zeigten aber in Bezug auf die Form wie die intramuskulär implantierten Konstrukte eine tendentielle Schrumpfung oder leichte Deformierung. Es lagen auch hier keine Anzeichen von Entzündung oder Resorptionsprozessen vor. Wie bei den subkutan implantierten Konstrukten waren die subkutan in den präfabrizierten Lappen implantierten Konstrukte umgeben von einer bindegewebigen Kapsel (Abb. 25).

Die histologische Toluidinblaufärbung zeigte in breiten Abschnitten der Konstrukte die Synthese von Knorpelmatrix (Abb. 26).



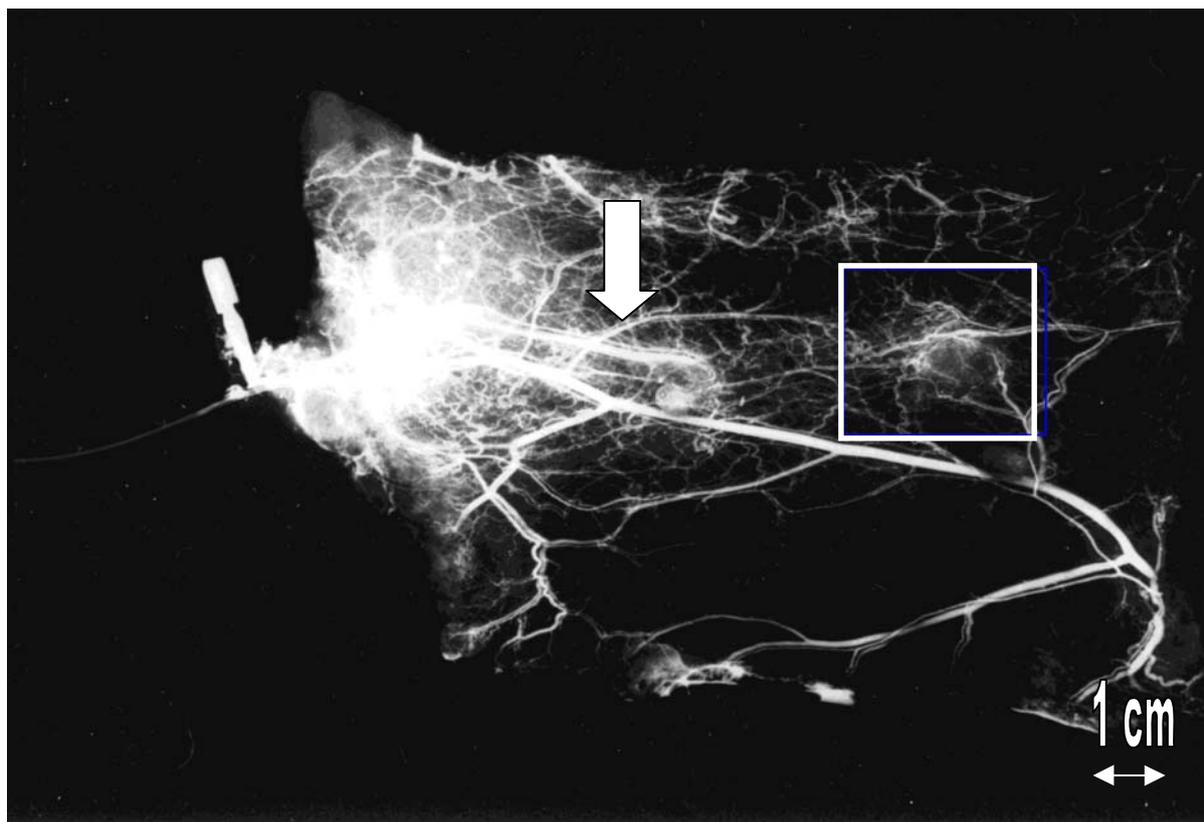
**Abb. 25:** Makroskopisch präfabrizierter Lappen mit Knorpelkonstrukt (Weißer Kasten), Aufsicht von unten



**Abb. 26:** Histochemischer Schnitt von in präfabrizierten Lappen implantiertes Konstrukt (Toluidinblaufärbung), blau: Nachweis von sauren Mucopolysacchariden (Vergrößerung x 400)

#### **6.3.1.6. Mikroangiografische Untersuchung**

Bei der Anlage des neofabrizierten Bauchhautlappen zeigte sich in der Angiographie ein guter Anschluß durch Neovaskularisation vom neugeschaffenen Gefäßstiel zum natürlichen Gefäßsystem der Bauchhaut (Abb. 27). Bei einem Tier in der 6- Wochen Gruppe war die angiografische Darstellung trotz vitalem Lappen nicht möglich aufgrund von einer Thrombosierung des Gefäßstiels. Diese Thrombosierung war zurückzuführen auf eine lokale Infektreaktion mit Serombildung.



**Abb. 27:** Angiografische Darstellung des Bauchhautlappens mit Knorpel (weißer Kasten) und implantiertem Gefäßstiel (Pfeil).

Wie in der 6- Wochen Gruppe zeigte sich auch in der 12- Wochen Gruppe nach der Anlage des präfabrizierten Bauchhautlappen nach der Implantationszeit eine gute Anbindung des Gefäßstiels an das natürliche Gefäßsystem der Bauchhaut. Bei einem Tier aus der 12- Wochen Gruppe konnte der Gefäßstiel aufgrund von Komplikationen nicht kanüliert werden. Eine makroskopische Untersuchung ergab aber einen durchgängigen und reizlosen Gefäßstiel.

## 6.4. Zusammenfassung Ergebnisse

Aus makroskopischer Sicht waren die Konstrukte gut erhalten in der Form, wobei sowohl in der 6- Wochen Gruppe als auch in der 12- Wochen Gruppe die in den präfabrizierten Bauchhautlappen und intramuskulär implantierten Konstrukte tendentiell stärker geschrumpft oder deformiert waren als die subkutan implantierten Konstrukte. Die Zell- Biomaterial- Konstrukte aus der stationären Langzeitkultur waren sehr gut erhalten in ihrer Form.

Die Konstrukte waren sowohl in der 6- Wochen Gruppe als auch in der 12- Wochen Gruppe vom Aspekt her knorpelartig.

Sie waren mechanisch stabil. Die Konsistenz der Konstrukte aus der 6- Wochen Gruppe ähnelte der Konsistenz von Knorpel. In der 12- Wochen Gruppe war die Konsistenz bei zwei Kaninchen zum Teil eher knöchern.

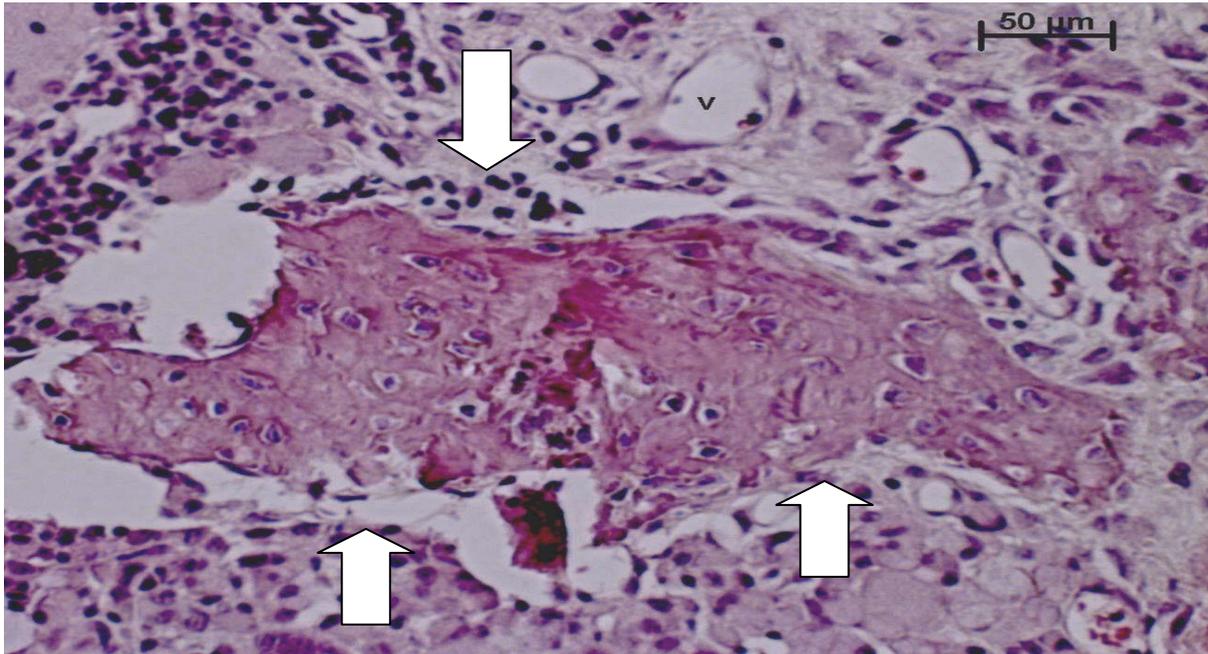
Bei einem Tier in der 12- Wochen Gruppe konnten nach der Implantationszeit keine Konstrukte mehr entdeckt werden.

Bei den anderen Konstrukten gab es keine makroskopischen und mikroskopischen Anzeichen von Resorptionsprozessen oder nekrotischen Arealen in den Implantaten.

Die histochemische Toluidinblaufärbung offenbarte die Synthese von Knorpelmatrix in breiten Teilen der Implantate. Die spezifische Analyse von Kollagen Typ II bestätigte den andauernden Prozess der Entwicklung von knorpelartigem Gewebe. Es zeigte sich auch eine geringe Expression von Kollagen Typ I in den Randbereichen. Das knorpelartige Gewebe war aber nicht vollständig homogen, sondern war durchwandert von fibrotischen Gewebe und überbleibenden Fasern des veresterten Hyluronsäurederivates, vor allem in der Mitte der Implantate.

Die an unterschiedlichen Orten implantierten Konstrukte zeigten letztlich histologisch keinen großen Unterschied in Bezug auf die Quantität der Knorpelmatrixneubildung sowie im Vergleich mit den Zellbiomaterialkonstrukten aus der stationären Kultur.

Die für 12 Wochen implantierten Konstrukte zeigten im Vergleich zu den 6 Wochen implantierten Konstrukten histologisch eine geringgradig vermehrte Knorpelneubildung. Jedoch waren bei zwei der Kaninchen aus der 12- Wochen Gruppe mehrere Bereiche von Verknöcherungen sichtbar (Abb. 28).



**Abb. 28:** Ossifikation (Pfeile) nach 12 Wochen Implantationszeit

Es gab keine histologischen Anzeichen von Entzündung, wesentlicher Gefäßeinsprossung in die Implantate oder nekrotische Areale.

Der Zellträger, der ohne Zellen zusätzlich als Negativkontrolle subkutan implantiert wurde, zeigte schon nach 6 Wochen histologisch ein Einwandern von verschiedenen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten. Es gab keinen Hinweis auf eine Knorpelneosynthese oder spezifische entzündliche Prozesse.

Bei der Anlage des neofabrizierten Bauchhautlappen zeigte sich sowohl in der 6- Wochen Gruppe als auch in der 12- Wochen Gruppe in der Angiographie ein guter Gefäßanschluß vom Gefäßstiel zum natürlichen Gefäßsystem der Bauchhaut.

Bei einem Tier in der 6- Wochen Gruppe war die angiografische Darstellung trotz vitalem Lappen nicht möglich aufgrund von einer Thrombosierung des Gefäßstiels. Diese Thrombosierung war zurückzuführen auf eine lokale Infektreaktion mit Serombildung.

Bei einem Tier der 12- Wochen Gruppe erfolgte keine Angiographie aufgrund von Komplikationen bei der Katheterisierung des Gefäßstiels. Eine Durchgängigkeit des Gefäßstiels konnte aber makroskopisch festgestellt werden.

## 7. Diskussion

### 7.1. Amplifikation und Differenzierungsverhalten der Chondrozyten

Mit Hinblick auf die spätere klinische Situation müssen isolierte Chondrozyten von einer kleinen Biopsie initial in Monolayerkulturen vermehrt werden, um einen genügend große Zellzahl für die Besiedelung der Biomaterialien zu erhalten (Aigner et al., 1998; Sittinger et al., 1994). Dieser wichtige Schritt auf dem Weg zur Herstellung von vitalen Knorpelimplantaten durch das Tissue Engineering bedingt aber eine Dedifferenzierung der Zellen (Benya et al., 1978, von der Mark et al., 1977).

Die Chondrozyten dieser Untersuchung zeigten eine gute Vermehrungsfähigkeit. Bei durchschnittlich 3,6 Passagen bis zur Besiedelung des Zellträgers zeigte sich schon nach der ersten Woche in der Monolayerkultur eine großer Teil der Zellen dedifferenziert. Die Zellen veränderten ihr Erscheinungsbild. Sie wandelten sich von runden zu mehr sternförmigen fibroblasten- ähnlichen Zellen und produzierten anstatt des knorpelspezifischen Kollagen Typ II das bindgewebstypische Kollagen Typ I.

Wenn die amplifizierten Zellen auf verschiedene dreidimensionalen Träger gesiedelt werden, kommt es zu einer Redifferenzierung der Zellen. Verschiedene Zellkulturmodelle und Trägermodelle (Guo et al., 1998) welche den Redifferenzierungsprozess auslösen und verstärken, wurden in der Literatur beschrieben (Aigner et. al., 1998, Homminga et al., 1993, Rotter et al., 1998, van Osch et al., 2000). In der vorliegenden Studie konnte dieser Redifferenzierungsprozess ausgelöst werden durch die Besiedelung eines dreidimensionalen Netzes aus einem veresterten Hyaluronsäurederivat. Die Zellen waren nach dem Redifferenzierungsprozess vor Implantation in der Lage, ausreichend Matrixbestandteile zu synthetisieren.

Es zeigte sich in der vorliegenden Studie wie auch in anderen Studien (Rotter 1997) über die in vitro Herstellung von Knorpelgewebe keine absolute Notwendigkeit für einen Einsatz von Wachstumsfaktoren wie z. B. BMP (Suzuki 1992). Jedoch gibt es auch Hinweise auf eine positiven Effekt von Wachstumsfaktoren wie z.B. von IGF-1

auf eine schnellere Vermehrung von humanen Chondrozyten in kürzerer Zeit als ohne Wachstumsfaktoren (Angele et al., 1998). Damit würden auch als Ausgangspunkt weniger autologe Chondrozyten zur Kultivierung notwendig sein und man hätte einen geringeren Hebedefekt. Eine weitere tierexperimentelle Studie zeigte keine statistisch signifikanten histologischen und biomechanischen Unterschiede von autologen Knorpelimplantaten mit und ohne Zusatz von IGF-1 und TGF- $\beta$  in der Züchtung nach einer Implantationszeit von 8 Wochen (Kaplan et al., 2003). Jedoch betrug die Zeit der Züchtungsphase hier nur 96 Stunden.

## 7.2. Bewertung Biomaterial und Modell

Bei allen Implantationen gab es weder Anzeichen von entzündlichen Reaktionen gegen das Biomaterial allein noch gegen die Zell- Biomaterial- Konstrukte. Viele Studien über unterschiedliche Biomaterialien sind nur *in vitro* gemacht worden. (Meinhart et al. 1999; Shea et al. 2000). Die meiste Information ist über *in vivo* Studien in immunsupprimierten Tiermodellen (Arevalo-Silva et al., 2000, Cao et al., 1997, Cima et al., 1991, Freed et al., 1993, Grande et al., 1997, Isogai et al., 1999, Mooney et al., 1996, Puelacher et al., 1994, Vacanti et al., 1991) erhältlich. In den beschriebenen Studien wurden nicht amplifizierte Chondrozyten vom Rind, Schwein oder Chondrozyten menschlichen Ursprungs auf Trägermaterialien besiedelt und die Knorpelneubildung wurde im Nacktmausmodell studiert. Jedoch fehlt in diesem Ansatz mögliche entzündliche Reaktionen oder andere Gewebeinteraktionen zu studieren. Weniger Studien wurden im autologen Modell durchgeführt (Britt und Park 1998, Cao et al., 1998, Park und Ward 1995, Xia et al., 2003) als gezüchtete Knorpelkonstrukte entweder in Kaninchen oder Schweine implantiert wurden. Konstrukte, die mit einem Träger aus Polyglykolsäure oder Kalziumalginat implantiert wurden zeigten eine ausgeprägte entzündliche und Fremdkörperreaktion. Sie bestanden im wesentlichen aus fibrotischen Gewebe mit nur undefinierbaren Knorpelknötchen im immunkompetenten Schweinemodell (Britt und Park 1998, Cao et al., 1998). Das bedeutet für solch ein Material eine klar eingeschränkte mögliche klinische Anwendung. In einer weiteren Studie zeigte sich im Schweinemodell ein Trägergerüst aus Chitosan- Gelatin- Komplex als weitgehend brauchbar zur

Züchtung von autologem Knorpel, jedoch wurden auch hier die Implantate nur subkutan implantiert (Xia et al., 2003).

In unserer Studie waren bei einem Tier aus der Dreimonatsgruppe die Implantate nicht mehr auffindbar. Die Frage ist, ob die Auflösung der Implantate durch eine immunologische Reaktion geschah, oder durch Zellnekrose oder andere Gründe wie z.B. mechanischer Stress. Es handelte sich nicht um die Hydrolyse zellfreier Konstrukte, weil die Lebensfähigkeit der Zellen jedes Implantates überprüft wurde durch ein besiedeltes Kontrollkonstrukt, das nicht implantiert wurde und in Kultur gehalten wurde. Diese in vitro Probe zeigte eine Knorpelneubildung, die der anderen in vitro Proben entsprach und so müssen diese Zellen zum Zeitpunkt der Implantation lebensfähig gewesen sein. Restfasern des Biomaterials wurden sowohl nach 3 Wochen der in vitro Kultivierung als auch nach 12 Wochen nach der in vivo Implantation beobachtet. Andere Untersucher (Campoccia 1998) zeigten eine Auflösung des Biomaterials in einer Salzlösung nach 10 Tagen. Dieses Ergebnis und andere Studien von anderen bioresorbierbaren Materialien wie z.B. Hydroxylapatit (Hutmacher 2000) führen zur Annahme, dass eine Umhüllung des Biomaterials mit Zellen einen hydrolytischen Abbau des Biomaterials verlangsamt.

### **7.3. Bewertung der Neofabrikation eines Lappen**

Der Transplantation eines Gewebelappens gerade im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie kommt eine immer größere Bedeutung zu. Trotz neuer mikrochirurgischen Techniken bleibt die klinische Anwendung aber limitiert v.a. durch die anatomisch bedingte oft nur begrenzt verfügbare Spenderregion (Zhou et al., 1994). Unter einer Präfabrikation eines Lappen versteht man eine Implantation eines ortsfremden autogenen Gefäßträgers in ein ausgewähltes Gebiet mit anschließender neugeschaffener und unabhängiger Blutversorgung und dadurch zuletzt möglicher Transplantation des Lappens. Die unterschiedlichen Arten der Präfabrikation sind die Expansion, die Kombination verschiedener Gewebe sowie die Implantation eines autologen Gefäßstiels (Geishauser und Schwarz 1995, Germann et al., 1998, Khouri et al., 1992). Es gibt unterschiedliche Gewebebestandteile wie z.B. das Omentum majus (Erol und Spira 1981), die als Gefäßträger dienen können. Die Vorteile eines präfabrizierten Lappens sind die Möglichkeit einer besseren Anpassung des zu

transplantierenden Lappens an die Gewebebeschaffenheit des Defektes durch Auswahl von Gewebetyp sowie u.a. Transplantatdicke. Auch die Schaffung kombinierter Transplantate mit verschiedener Gewebetypen ist auf diese Art und Weise möglich. Durch das Einbringen vorgefertigter künstlicher oder heterologer Substanzen ist es möglich, die Rekonstruktion von Nase oder Ohr zu erleichtern (Klöppel 1994). In vorangehenden Studien wurde das verwendete Operationsmodell mit der Schaffung eines präfabrizierten Bauchhautlappens unterschiedlicher Art am Kaninchen etabliert. Es wurde der Vergleich Ligatur/ Anastomose, Implantation eines Gewebeexpanders im Vergleich mit Silikonsheeting und der Vergleich implantierte Arterie/ Vene bewertet (Hoang 1997, Schweinbeck 1999, Werner 2000). Die Anlage des Gefäßstiels in dieser Studie erfolgte mit einer implantierten Arterie aufgrund einer leichteren operativen Handhabung sowie einer geringeren Thromboserate im Vergleich zu einer implantierten Vene (Werner 2000). Die Voraussetzung für die Versorgung des zu transplantierenden Lappens ist eine Verbindung zwischen implantierten Gefäßstiels und Gefäßbett des Lappens. Dieser Anschluß des Gefäßstiels an das Gefäßbett konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, die Art und Weise, beeinflussende Faktoren sowie Ausmaß und Dauer dieser „Neovaskularisation“ sind bisher jedoch ungeklärt. Die Variante mit einer arteriovenösen Anastomose birgt jedoch gerade aufgrund der Größe der anastomosierenden Gefäße (Gefäßdurchmesser ca 1 mm) die Gefahr technischer Komplikationen wie z.B. die Thrombosierung des Gefäßstiels. Bei vorangehender Erlernung des Modells sowie mikrochirurgischer Techniken zeigte sich die Durchführung als jedoch gut realisierbar.

Zusammenfassend bleiben bei der Präfabrikation eines Lappens durch ein einzelnes Gefäß noch vielen Fragen offen und weitere klinische Studien sind notwendig zur fortführenden Evaluation.

## **7.4. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung**

### **7.4.1. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung subkutan**

Die subkutane Implantation sah eine sehr gut vaskularisierte Umgebung mit einer sehr niedrigen mechanischen Belastung für die Konstrukte vor.

Die subkutan implantierten Konstrukte zeigten sich gut erhalten in der Form und waren vom makroskopischen Aspekt her knorpelartig.

Über subkutan implantierte Konstrukte ist bis jetzt die meiste Information durch Studien vorhanden, sowohl im autologen als auch im allogenen Tiermodell (Arevalo-Silva et al., 2000, Britt und Park 1998; Cao et al., 1998, Cao et al., 1997, Grande et al., 1997, Isogai et al., 1999, Mooney et al., 1996). In vielen dieser Studien zeigte sich eine Knorpelentwicklung mit weitgehender Erhaltung der Form der subkutan implantierten Konstrukte, so dass die Ergebnisse dieser Studie sich in Bezug auf die subkutane Implantation weitgehend mit Resultaten aus anderen Studien decken und keine Überraschung darstellen.

#### **7.4.2. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung intramuskulär**

Die intramuskuläre Implantation sah ein sehr gut vaskularisierte Umgebung und einen zusätzliche mechanische und dynamische Belastung vor.

Die intramuskulär implantierten Konstrukte waren auch nach 12- wöchiger Implantationszeit gut erhalten in der Form und widerstanden damit der mechanischen Stresssituation im Muskel. Sie zeigten lediglich ebenso wie die in den präformierten Lappen implantierten Konstrukte eine leichte Tendenz zur Schrumpfung und Deformierung.

In verschieden bisherigen in vitro Versuchen führte eine mechanische Belastung von Chondrozyten zu einer erhöhten Proteoglykansynthese (Parkinnen et al., 1992; Quinn et al., 1998). Eine weitere Studie zeigte eine signifikante Zunahme der Dicke gezüchteter Knorpelkonstrukte sowie eine Zunahme der extrazellulären Matrix nach intermittierender mechanischer Kompression im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (Waldman et al., 2003).

Die Annahme, die Implantate würden unter dem zusätzlichen dynamischen Stress eine ausgeprägtere Knorpelneosynthese als ohne mechanische Belastung entwickeln, bestätigte sich nicht in der vorliegenden Studie. Histologisch zeigte sich in breiten Teilen der Implantate eine Knorpelneosynthese. Diese war jedoch nicht stärker ausgeprägt als bei den subkutan implantierten Konstrukten oder den Konstrukten die in den präfabrizierten Lappen implantierten wurden. So bleibt die Frage, ob der M. rectus femoris als Implantationsort richtig gewählt war und

überhaupt einen ausreichenden mechanischen Streß auf die Konstrukte erzeugt hatte oder ob die Ergebnisse aus den bisherigen in vitro Studien sich nicht auf in vivo Versuche übertragen lassen.

### **7.4.3. Bewertung Knorpelkonstruktentwicklung im präfabrizierten Lappen**

Die Konstrukte, die in den präfabrizierten Lappen implantiert wurden, zeigten eine geringgradige Deformation oder Schrumpfung. Die Angiographie zeigte eine Angiogenese mit Anbindung des implantierten Gefäßstieles an das ursprüngliche Gefäßsystems des Bauchhautlappens (Klöppel et al., 1997). Die Integration des tissue- engineerter Knorpelkonstruktes zeigte eine kleine Wolke von Gefäßen, die das Konstrukt umgab, ohne jegliches Einwachsen von Gefäßen in das Konstrukt selbst. Sehr überraschend gab es jedoch keine Anzeichen von Zellnekrose oder Verlust des Biomaterial- Zell- Konstruktes bezogen auf diese anfängliche schlechte Versorgungsphase des Konstruktes. Es scheint, das die Diffusion von Nährstoffen aus dem umgebenden Gewebe ausreicht um das Konstrukt in der frühen ischämischen Phase zu versorgen, da es nur geringgradigen Deformationen und Schrumpfungen der Konstrukte gab.

Dies bekräftigt , das es möglich ist eine zweiten Gewebekomponente wie z.B. tissue- engineerter Knorpel in einen neofabrizierten mikrovaskulären Lappen zu integrieren (Pribaz et al., 2001). So gibt es die Möglichkeit individuelle freie Lappen zu schaffen für besondere Defekte unabhängig von anatomischen Gegebenheiten mit einem minimalen Hebedefekt. Darüberhinaus erweitert das das Feld eines möglichen Gebrauchs von tissue engineerter Knorpel in der rekonstruktiven Chirurgie.

In einer anderen Studie (Britt und Park 1998) wurde tissue- engineerter Knorpel an eine intraindividuellen, unterschiedliche Stelle transplantiert. Es zeigte sich das der Knorpel nekrotisch wurde aufgrund einer fehlenden integrierten Blutversorgung. Bei dem freien Lappen mit der Blutversorgung in Form von einer Gefäßwolke und der Anastomose hat man die Möglichkeit diese zusammen mit dem tissue- engineerter Konstrukt zu verpflanzen und reduziert damit die Möglichkeit einer Zellnekrose. Dieser kombinierte Ansatz scheint sehr vielversprechend für die Zukunft. In weiteren Studien sollten aber vorerst ebenfalls die vorangehenden Schritte wie die

---

Amplifizierungsmethode sowie u.a. die Selektion des Trägermaterials für einen klinischen Gebrauch evaluiert und optimiert werden.

#### **7.4.4. Zusammenfassung Bewertung der Knorpelkonstrukte bezüglich der unterschiedlichen Implantationsorte**

An allen drei Implantationsorten war die Entwicklung von Knorpel offensichtlich: Im subkutanen Gewebe, intramuskulär und im neofabrizierten Bauchhautlappen. Es gab keinerlei Anzeichen von Knorpelentwicklung in den Kontrollimplantaten (Biomaterial ohne Zellen). Die histologischen Untersuchungen zeigten eine Neosynthese von Knorpelgewebe in breiten Teilen der Implantate. Jedoch wurden auch Abschnitte ohne Knorpelneosynthese gesehen. Hierbei ist nicht klar, ob diese Zellen in diesen Abschnitten ruhende Zellen sind, die knorpelspezifisches Kollagen und Proteoglykane zu einem gewissen Zeitpunkt produzieren. Diese Zellen könnten sich auch dedifferenziert haben und könnten die vorhergenannte Eigenschaft verloren haben. Auch das Phänomen der Zellnekrose und des konsekutiven Ersatzes der Zellen durch andere Zellen könnte eine Erklärung für diese Gebiete darstellen.

Bezogen auf die unterschiedliche Implantationsorte zeigte sich letztlich histologisch kein gravierender Unterschied in der Quantität der Knorpelneuentwicklung in den einzelnen Implantaten. Es scheint, daß die unterschiedlichen physiologische Bedingungen bezogen auf die mechanische Belastung und Durchblutung sich nicht ausgewirkt haben auf die Quantität der Knorpelneusynthese. Sowohl die Konstrukte aus der 6 Wochen Gruppe als auch in der 12 Wochen Gruppe waren vom Ausmaß der Knorpelneubildung ungefähr gleich zu bewerten. In der 12 Wochen Gruppe zeigte sich gegenüber der 6 Wochen Gruppe eine geringfügig vermehrte Bildung von knorpelartigem Gewebe.

Makroskopisch zeigten jedoch die Konstrukte, die intramuskulär in den M. rectus femoris und in den präfabrizierten Bauchhautlappen implantiert wurden, eine geringfügige Schrumpfung und Deformation im Gegensatz zu den subkutan implantierten Konstrukten. Wie weit dieser Prozess letztlich Einfluß nimmt auf die Neosynthese von Knorpel ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu sagen und sollte Gegenstand weiterer Studien sein mit einer längeren Implantationszeit für die Konstrukte.

In zwei Tieren der 12 Wochen Gruppe zeigten sich mikroskopisch einige verknöcherte Bereiche. Dieses Phänomen ist speziell bekannt für Kaninchen und Knorpel generell (Kandel et al.; 1999).

## **7.5. Ausblick und Perspektiven von Tissue Engineering von Knorpel**

In der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie herrscht ein großer Bedarf an Ersatzmaterialien wie z.B. Knorpel oder Knochen. Die Herstellung autologer Knorpeltransplantate mit Hilfe des „Tissue Engineering“ bietet die Möglichkeit vitales Gewebe in entsprechenden Umfang bereitzustellen.

Der Lösungsansatz Knorpelkonstrukte mit Hilfe von isolierten Chondrozyten zu züchten scheint aufgrund von seinen guten Voraussetzungen (u.a. geringer Hebedefekt bei kleiner Knorpelbiopsie) für die Anwendung am Patienten geeignet zu sein.

Folgende Probleme sollten aber vor Anwendung beim Patienten noch geklärt bzw. verbessert werden:

Die momentane Vermehrungszeit der Chondrozyten in der Monolayerkultur beträgt mindestens 3 Wochen, bevor die Besiedelung eines dreidimensionalen Trägers erfolgen kann. Zur Verkürzung dieser Zeit könnte die Anwendung von Wachstumsfaktoren hilfreich sein, die die Proliferationsgeschwindigkeit und damit die Zellausbeute erhöhen (van Osch et al., 2002).

In den verschiedenen Transplantaten zeigten sich immer wieder Abschnitte ohne Matrixsynthese. Um die Qualität des in vitro gezüchteten Knorpels zu steigern und eine bessere Ausgangsposition für die nachfolgenden in vivo Verhältnisse zu schaffen, sollten Kultursysteme einbezogen werden, die eine homogenere Verteilung der Zellen innerhalb der Konstrukte möglich machen. Rotierende Bioreaktoren führten in verschiedenen Studien zur Verbesserung der Qualität von in vitro gezüchtetem Knorpel (Pei et al., 2002, Vunjak-Novakovic et al., 2002).

Ein weitere Schritt wäre die Einbeziehung der Gentechnik. Tissue engineering von Knorpel mit genetisch modifizierte Chondrozyten erwies sich in einem Versuch effizienter in der Chondrogenese als mit normalen Chondrozyten (Madry et al., 2002).

Es gibt viele Trägermaterialien, die durch ihre Eigenschaften geeignet sind für die Zelltransplantation. Grundvoraussetzungen betreffen hierbei die Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit, Konsistenz, strukturelle Eigenschaften und Sterilisierbarkeit. (Sittinger et al., 1994; Bujia 1995). Welches Trägermaterial am besten für den klinischen Einsatz geeignet ist, muß erst noch in weiteren Studien mit längeren Implantationszeiten evaluiert werden. Auch eine Kombination unterschiedlichen Biomaterialien oder von gleichen Biomaterialien in unterschiedlicher Konsistenz wäre denkbar.

Wenn die autologe Knorpeltransplantation mit Hilfe von Tissue Engineering beim Patienten angewendet wird, sollte auf fetales Kälberserum verzichtet werden, da eine Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Versuche mit humanen Serum zeigten, dass im Vergleich zum fötalen Kälberserum gleiche oder sogar höhere Proliferationsraten der Chondrozyten erreicht werden können (Gruber et al., 1996). Eine andere Alternative wäre der Einsatz von Serum-freien Medium (Mandel et al., 2002).

Eine weitere Studie zeigte bei der in vitro Herstellung von humanem autologen Knorpel mit humanem Serum eine weitgehende Zerstörung des Knorpels bei Ersatz des humanen Serum mit fötalem Kälberserum (Anderer et al., 2002).

Neben den vielen in vitro Studien müssen sowie die vorliegende Studie noch weitere tierexperimentelle in vivo Studien folgen, die nicht nur das Verhalten von Knorpelkonstrukten subkutan untersuchen, sondern bei denen die Konstrukte unterschiedlichen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind. Erst wenn es möglich ist, gute reproduzierbare nachvollziehbare Ergebnisse zu erhalten, ist ein klinischer Einsatz am Patienten möglich.

Bei Verbesserung der aufgeführten momentanen Probleme könnten in Zukunft bei klinischer Anwendbarkeit viele Patienten in der rekonstruktiven und plastischen

Chirurgie vom Tissue Engineering von Knorpel mit dem Ansatz von differenzierten Chondrozyten profitieren.

## 8. Zusammenfassung

Tissue Engineering von autologen Knorpel scheint eine versprechende Methode zu sein, um Knorpeldefekte u.a. in der rekonstruktiven Chirurgie zu decken.

Der Ansatz dieser Studie beinhaltete die Entnahme von Knorpelbiopsien aus Ohren von Chinchilla Bastard Kaninchen und anschließender Isolation der Chondrozyten. Die Zellen wurden in Monolayerkulturen vermehrt und nach Erhalt einer genügenden Zellzahl auf ein dreidimensionales Trägergerüst gesiedelt. Die Amplifikation bedingte eine Dedifferenzierung der Chondrozyten. Hierfür bewirkte die Absiedelung in das dreidimensionale Trägergerüst eine Redifferenzierung der Zellen. Als Biomaterial wurde ein verestertes Hyaluronsäurederivat (HYAFF 11®) benutzt. Die amplifizierten Zellen wurden konsequent auf die Trägergerüst angesiedelt und letztlich an unterschiedlichen Stellen im autologen Kaninchen für bis zu 12 Wochen reimplantiert.

Das Hauptziel der Studie war es, das in vivo Verhalten der tissue- engineerter Konstrukte im autologen Kaninchenmodell unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurden folgende Implantationsorte gewählt:

1. Subkutan in die laterale Bauchwand,
2. Intramuskulär in den M. rectus femoris und
3. in einen präfabrizierten Bauchhautlappen mit Implantation eines Gefäßstieles.

Die subkutane Implantation sieht eine gut vaskularisierte Umgebung mit einer niedrigen mechanischen Belastung vor. Die intramuskuläre Implantation sieht eine sehr gut vaskularisierte Umgebung verbunden mit hohem mechanischen Streß vor. Letztlich simuliert die Implantation in den präfabrizierten Lappen eine häufig auftretenden Situation in der rekonstruktiven Chirurgie, in der die Implantate einer Ischämie während der ersten Wochen der Implantation ohne mechanischen Streß unterliegen. Damit sollte als weiteres Ziel die mögliche Kombination eines präfabrizierten Lappens mit tissue- engineerter Knorpel untersucht werden. Zusätzlich wurde ein Kontrollvlies ohne Zellen in die subkutane Bauchwand implantiert.

Nach Ablauf der Implantationszeit erfolgte eine selektive Mikroangiografie des präfabrizierten Bauchhautlappens. Diese diente zum Nachweis des Anschlusses des

---

implantierten Gefäßstiels an das lokale Gefäßnetz und somit Versorgung des Lappens. Die Implantate wurden makroskopisch sowie histochemisch und immunhistochemisch untersucht. Diese Untersuchungen dienten dem Nachweis von knorpelspezifischen Matrixbestandteilen.

Folgende Ergebnisse der Präparate und des präfabrizierten Lappens konnten beschrieben werden:

1. Die implantierten Konstrukte blieben stabil in der Form. Die intramuskulär und in den präfabrizierten Lappen implantierten Konstrukte waren im Gegensatz zu den subkutan implantierten Konstrukten geringgradig geschrumpft.
2. Die Ergebnisse zeigten die Entwicklung eines knorpelähnlichen Gewebes, was ersichtlich war an der Expression von knorpelspezifischen Kollagen Typ II und Proteoglykanen.
3. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Expression von knorpelspezifischen Kollagen Typ II und von Proteoglykanen bezüglich der unterschiedlichen Implantationsorte.
4. In der 12- Wochen Gruppe zeigte sich gegenüber der 6- Wochen Gruppe eine geringfügig vermehrte Bildung von knorpelartigem Gewebe. Bei zwei Tieren zeigten sich nach 12 Wochen Implantationszeit mehrere Ossifikationen in allen Implantaten.
5. Tissue- engineerter Knorpel in einem präfabrizierten Hautlappen könnte neue Möglichkeiten in der rekonstruktiven Chirurgie bieten, indem man Lappen mit verschiedenen Gewebekomponenten anhand der speziellen Erfordernisse eines Defektes herstellt. Somit würde sich die Variabilität und das Transplantationsangebot solcher Lappen vergrößern und man könnte die Rekonstruktion verschiedener Strukturen deutlich erleichtern.

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 : Studienkonzept
- Abb. 2: Sediertes Kaninchen mit aufgezeichneten Schnittstellen und Implantationsorten: 1. Subkutan in Lappen, 2. Intramuskulär in M. rectus femoris, 3. Subkutan in laterale Bauchwand, 4. Kontrollvlies subkutan in laterale Bauchwand
- Abb. 3: Makroskopisches Bild von HYAFF 11®
- Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HYAFF 11® in Form eines nichtgewobenen Netzes
- Abb. 5: Inzision und nach proximal geschlagener Hautlappen am Kaninchenohr
- Abb. 6: Gehobener Knorpel mit Blick auf die Innenhaut des Ohres
- Abb. 7: Kaninchenohr nach Wundverschluss
- Abb. 8: Planung des Bauchhautlappens
- Abb. 9: Freipräparierte Arterie (Gefäßklemmchen mit Skalierung) und proximaler Venenstumpf (Pfeil)
- Abb. 10: Gefäßdoppelklemme mit Stumpf der A. saphena links und V. femoralis rechts vor End- zu- End Anastomose
- Abb. 11: Gefäßstiel nach Anastomose, nach kranial umgeschlagen unter die Bauchhaut
- Abb. 12: Wundverschluss und Implantationsorte (Markierung)
- Abb. 13: Trypanblaufärbung der isolierten Chondrozyten in der Zählkammer
- Abb. 14: Zellvermehrung in Monolayerkultur: Kaninchen nach 12 Wochen geopfert mit \* , Kaninchen im Versuchsverlauf verstorben mit + versehen
- Abb. 15: Während P1 fünf Tage nach Zellisolation
- Abb. 16: Live- Dead –Test : Konstrukt vor Implantation in Kaninchen: Lebende Zellen grün, („tote“) Fasern des Trägermaterials rot (Pfeil)
- Abb. 17 Zell- Biomaterial- Konstrukt nach 12 Wochen in stationärer Kultur makroskopisch
- Abb. 18 Immunhistochemischer Schnitt: Zell- Biomaterial- Konstrukt nach 12 Wochen in stationärer Kultur (APAAP-Färbung), rot: Kollagen Typ II

- Abb. 19: Unterschiedliche Implantate nach Explantation. Von links nach rechts: Kontrollvlies (Ko), Subkutanes Konstrukt (Sk), Lappenkonstrukt (La), intramuskuläres Konstrukt (Im)
- Abb. 20: Kontrollvlies mit eingewanderten Zellen und Restfasern (dunkelblau) nach 6-wöchiger Implantationszeit (Toluidinblaufärbung), Vergrößerung x 200
- Abb. 21: Subkutan implantiertes Konstrukt
- Abb. 22: Immunhistochemischer Schnitt: Subkutan implantiertes Konstrukt (APAAP- Färbung), rot: Kollagen Typ II (Pfeil), weißlich: Restfasern des Biomaterials
- Abb. 23: Knorpelkonstrukt (weißer Kasten) im M. rectus femoris
- Abb. 24: Histochemischer Schnitt: Intramuskulär implantiertes Konstrukt (Alcianblaufärbung), blau: Proteoglykane (Vergrößerung x 400)
- Abb. 25: Makroskopisch präfabrizierter Lappen mit Knorpel (Weißer Kasten), Aufsicht von unten
- Abb. 26: Histochemischer Schnitt von in präfabrizierten Lappen implantiertes Konstrukt (Toluidinblaufärbung), blau: Nachweis von sauren Mucopolysacchariden (Vergrößerung x 400)
- Abb. 27: Angiografische Darstellung des Bauchhautlappens mit Knorpel (weißer Kasten) und implantiertem Gefäßstiel (Pfeil)
- Abb. 28: Ossifikation (Pfeile) nach 12 Wochen Implantationszeit
- Tab. 1: Zellzahl der isolierten Chondrozyten x  $10^6$  nach Enzymverdau (EV) sowie Amplifikation der isolierten Chondrozyten über 3- 5 Passagen mit Mittelwerten

## 10. Literatur

**Aigner J., Tegeler J., Hutzler P., Campoccia D., Pavesio A., Hammer C., Kastenbauer E., Naumann A.**

Cartilage tissue engineering with a novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester.

J Biomed Mater res 42 (1998): 172-181

**Anderer U., Libera J.**

In vitro engineering of human autogenous cartilage.

J Bone Miner Res 17 (2002): 1420 -1429

**Andreassi L., Casini L., Trabuchi E., Diamantini S., Rastrelli A., Donati L., Tenchini M.L., Malcovati M.**

Human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid suitable for grafting.

Wounds 3 (1991): 116-126

**Angele P., Faltermeier H., Kujat R., Maghsudi M., Moller H.D., Nerlich M.**

Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD.

Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd. 115 (1998): 205-208

**Arevalo-Silva C.A., Cao Y., Vacanti M., Weng Y., Vacanti C.A., Eavey R.D.**

Influence of growth factors on tissue- engineered pediatric elastic cartilage.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg 126 (2000): 1234-1238

**Barone R., Pavaux C., Blin P.C., Cuq P.**

Atlas D' Anatomie du lapin, Atlas of rabbit anatomy.

Masson & Cie, editeurs, Saint- Germain Paris (1973): 131, 139

**Benya P.D., Shaffer J.D.**

Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.

Cell 30 (1982): 215-224

**Benya P.D., Padilla S.R., Nimni M.E.**

Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of dedifferentiated function in culture.

Cell 15 (1978): 1313-1321

**Berghaus A.**

Alloplastic implants in head and neck surgery.

Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl 1 (1992): 53-95

**Britt J.C, Park S.S.**

Autogenous tissue engineered cartilage: evaluation as an implant material.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124 (1998): 671-677

**Bujia, J.**

Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen.

Laryngo-Rhino-Otol 74 (1995): 205-210

**Bujia J., Wilmes E., Hammer C.**

Immunologic behavior of human tracheal transplants

Laryngo-Rhino-Otol 71 (1992): 353-358

**Campoccia D., Doherty P., Radice M., Brun P., Abatangelo G., Williams D.F.**

Semisynthetic resorbable materials from hyaluronen esterification.

Biomat 19 (1998): 2101-2127

**Cao Y., Vacanti J.P., Paige K.T., Upton J., Vacanti C.A.**

Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue engineered cartilage in the shape of a human ear.

Plast Reconstr Surg 100 (1997): 297-304

**Cao Y., Rodriguez A., Vacanti M., Ibarra C., Arevalo C., Vacanti C.A.**

Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage.

J Biomater Sci Polym Ed 9 (1998): 475-487

**Cima L.G., Vacanti J.P., Vacanti C., Ingber D., Mooney D., Langer R.**

Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates.

J Biomech Eng 113 (1991): 143-151

**Cordell J.L., Fallini B., Erber W.N.**

Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes.

J Histochem Cytochem 32 (1994): 219-229

**Donati L., M. Marazzi, Veronesi A.M., Ordanini M.N., Falcone L., Ferrone M., Mauri S.**

Treatment of cutaneous wound with cultured human keratinocytes on hyaluronic acid membrane.

Wound Rep Regen 3 (1995): 363

**Dustman H.O., Puhl W., Kempfen B.**

Die Zellteilung im Gelenkknorpel

Arch Orthop Unfall-Chir 79 (1974): 171-182

**Elwany S.**

Histochemical study of cartilage autografts in tympanoplasty.

J Laryngol Otol 99 (1985): 637-642

**Erk Y., Rose F.A., Spira M.**

Vascular augmentation of skin and musculocutaneous flaps.

Ann Plast Surg 10 (1983): 341-348

**Erol O.O., Spira M.**

Utilization of a composite island flap employing omentum in organ reconstruction: an experimental investigation.

Plast Reconstr Surg 68 (1981): 561-750

**Falco N.A., Pribaz J.J., Eriksson E.**

Vascularization of skin following implantation of an arteriovenous pedicle: implications in flap prefabrication.

Microsurgery 13 (1992): 249-254

**Freed L.E., Marquis J.C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A.G., Langer R.**

Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers.

J Biomed Mat Res 27 (1993): 11-23

**Geishauser M., Schwarz M.**

Freie mikrovaskuläre und axial gestielte Lappen.

Verlag Hans Huber, Bern Göttingen Toronto Seattle (1995): 111-118, 125-140, 215-217

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

Vorfabrizierte Lappenplastiken (Prefabricated flaps)

Ein neues rekonstruktives Konzept.

Othopäde 27 (1998): 451-456

**Grande D.A., Halberstadt C., Naughton G., Schwartz R., Manji R.**

Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts.

J Biomed Mat Res 34 (1997): 211-220

**Gruber R., Sittinger M., Bujia J.**

Untersuchungen zur in vitro Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung des möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen- Erkrankung.

Laryngo-Rhino-Otol 75 (1996): 105-108

**Guo J.F., Jourdian G.W., MacCallum D.K.**

Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. Connect Tissue Res 19 (1989): 277-297

**Hammer C., Bujia J.**

Immunologie vitaler und konservierter Transplantate  
Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl. 1 (1992): 3-26

**Harrison E.T. Jr., Luyten F.P., Reddi A.H.**

Osteogenin promotes reexpression of cartilage phenotype by dedifferentiated articular chondrocytes in serum-free medium.

Exp Cell Res 192 (1991): 340-345

**Hellmich S.**

Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich  
HNO 30 (1982): 140-144

**Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J.**

Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: an experimental model in rabbits.

Ann Plast Surg 21 (1988): 342-347

**Hoang N.T.**

Die Neovaskularisation im präformierten Lappen in Abhängigkeit vom arteriovenösen Blutfluß des implantierten Gefäßstiels.

Med Diss TU München (1997)

**Homminga G.N., Buma P., Koot H.W., van der Kraan P.M., van den Berg W.B.**

Chondrocyte behaviour in fibrin glue in vitro.

Acta Orthop Scand 64 (1993): 441-445

**Hörl H.W., Klöppel M., Biemer E.**

Prefabricated free flaps with vaskularized porous polytetrafluorethylene (proplast II) frameworks in a rabbit model.

Eur J Plast Surg 17 (1994): 144-150

**Hutmacher D.W.**

Scaffold in tissue engineering bone and cartilage.

Biomaterials 21 (2000): 2529- 2543

**Isogai N., Landis W., Kim T.H., Gerstenfeld L.C., Upton J., Vacanti J.P.**

Formation of phalanges and small joints by tissue engineering.

J Bone Joint Surg Am 81 (1999): 306-316

**Itoh Y.**

An experimental study of prefabricated flaps using silicone sheets, with reference to the vascular patternization process.

Ann Plast Surg 28 (1992): 140-146

**Kandel R., Hurtig M., Grynopas M.**

Characterization of the mineral in calcified articular cartilagenous tissue formed in vitro.

Tissue Eng 5 (1999): 25-34

**Kaplan B.A., Gorman C.R., Gupta A.K., Taylor S.R., Iezzi J.C., Park S.S.**

Effects of transforming growth factor Beta and insulinlike growth factor 1 on the biomechanical and histologic properties of tissue-engineered cartilage

Arch Facial Plast Surg 5 (2003): 96-101

**Kastenbauer E.R.**

Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich

HNO 31 (1983): 371-380

**Khouri R.K., Upton J., Shaw W.W.**

Prefabrication of composite free flaps through staged transfer: an experimental and clinical study.

Plast Reconstruct Surg 87 (1991): 108-115

**Khouri R.K., Upton J., Shaw W.W.**

Principles of flap prefabrication.

Clin Plast Surg 19 (1992): 763-71

**Klöppel M., Nguyen The Hoang, Graf P., Laubenbacher C., Schwaiger M., Biemer E.**

Die Neovaskularisation im präformierten Gewebelappen in Abhängigkeit vom arteriovenösen Blutfluss des implantierten Gefäßstiels. Experimentelle Untersuchung am Kaninchen.

Langenbecks Arch Chir Suppl II (1997): 1379-1380

**Klöppel M.**

Vaskularisierbare, poröse Kunststoffe als Gerüstmaterial in präformierten, freitransplantierbaren, hautgedeckten Lappen

Dissertation TU München (1994)

**Krause W.**

Die Anatomie des Kanichens in topografischer und operativer Rücksicht.

Wilhelm Engelmann Verlag, Leipzig (1868): 100-103, 190-201

**Kühnel W.**

Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie

Georg Thieme Verlag Stuttgart (1992): 116

**Langmann J.**

Medizinische Embryologie

Georg Thieme Verlag Stuttgart (1985): 407

**Leonhardt H.**

Histologie, Zytologie und mikroskopische Anatomie

Georg Thieme Verlag Stuttgart (1990): 133-137

**Löffler G.**

Physiologische Chemie

Springer Verlag (1985): 52-53

**Madry H., Padera R., Seidel J., Langer R., Freed L.E., Trippel S.B., Vunjak-Novakovic G.**

Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage.

Hum Gene Ther September 13 (2002): 1621-1630

**Mandl E.W., Van Der Veen S.W., Verhaar J.A., Van Osch G.J.**

Serum-free medium supplemented with high-concentration FgF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity.

Tissue Eng Aug 8 (2002): 573-580

**McKee N.H., Clarke H.M., Nigra C.A., Manktelow R.T.**

A study of blood flow and pressure in the vessels supplying a free flap.

Plast Reconstr Surg 69 (1982): 68-73

**Meinhart J., Fussenegger M., Hobling W.**

Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction.

Ann Plast Surg 42 (1999): 673- 678

**Moll K.J., Moll M.**

Anatomie

Jungjohann Verlag Neckarsulm (1995): 62

---

**Mooney D.J., Mazzoni C.L., Breuer C., McNamara K., Hern D., Vacanti J.P., Langer R.**

Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering.  
Biomaterials 17 (1996): 115-124

**Park S.S., Ward M.J.**

Tissue- engineered cartilage for implantation and grafting.  
Fac Plast Surg 22 (1995): 278-283

**Parkkinen J.J., Lammi M.J., Helminen H.J., Tammi M.**

Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro.  
J Orthop Res 10 (1992): 610- 620

**Pei M., Solchaga L.A., Seidel J., Zeng L., Vunjak-Novakovic G., Caplan A.I., Freed L.E.**

Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds.  
FASEB J 16 (2002): 1691-1694

**Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S, Marshak D.R.**

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.  
Science 284 (1999): 143-146

**Pirsig W., Bean J.K., Lenders H., Verwoerd C.D., Verwoerd-Verhoef H.L.**

Cartilage transformation in a composite graft of demineralized bovine bone matrix and ear perichondrium used in a child for the reconstruction of the nasal septum.  
Int J Pediatr Otorhinolaryngol 32 (1995): 171-181

**Pribaz J.J., Fine N., Orgill D.P.**

Flap prefabrication in the head and neck: a 10-year experience.  
Plast Reconstr Surg 103 (1999): 808-820.

**Pribaz J.J., Fine N.A.**

Prefabricated and prelaminated flaps for head and neck reconstruction.

Clin Plast Surg 28 (2001): 261-272

**Puelacher W.C., Mooney D., Langer R., Upton J., Vacanti J.P., Vacanti C.A.**

Designs of nasoseptal cartilage replacements synthesised from biodegradable polymers and chondrocytes.

Biomaterials 15 (1994): 774-778

**Quinn T.M., Grodzinsky A.J., Buschmann M.D., Kim Y.J., Hunziker E.B.**

Mechanical compression alters proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants.

J Cell Sci 111 (1998): 573- 583

**Radin E.L, Burr D.B.**

Hypothesis: Joints can Heal

Semin Arthritis Rheum 13 (1984): 293-302

**Rettinger G.**

Autogenous and allogenic cartilage transplants in head and neck surgery (excluding middle ear and trachea)

Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl 1 (1992): 127-162

**Riesle J., Hollander A.P., Langer R., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G.**

Collagen in tissue- engineered cartilage: types, structure and crosslinks.

J Cellular Biochem 71 (1998): 313-327

**Rotter N.**

Untersuchungen zum in vivo Verhalten von in vitro gezüchteten vitalen Knorpeltransplantatmaterial.

Med Diss LMU München (1997)

---

**Rotter N., Aigner J., Naumann A., Planck H., Hammer C., Burmester G., Sittinger M.**

Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of a resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage.

J Biomed Mater Res 42 (1998): 347-356

**Saadeh P.B., Brent B., Mehrara B.J., Steinbrech D.S., Ting V., Gittes G.K., Longaker M.T.**

Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation and characterization for construct development.

Ann Plast Surg 42 (1999): 509-513

**Schweinbeck S.**

Die Neovaskularisation im präformierten Gewebelappen unter Einfluß eines Gewebeexpanders : Tierexperimentelle Studie am Kaninchen

Vet Med Diss LMU München (1999)

**Shea L.D., Wang D., Franceschi R.T., Mooney D.J.**

Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three- dimensional scaffold.

Tissue Eng 6 (2000): 605- 617

**Sittinger M., Bujia J., Minuth W.W., Hammer C., Burmester G.R.**

Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture.

Biomaterials 15 (1994): 451- 456

**Solchaga L.A., Dennis J.E., Goldberg V.M., Caplan A.I.**

Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage.

J Orthop Res 17(1999): 205-213

**Stock W., Lewan U., Lukas B., Deiler S.**

Plastisch-chirurgische Weichteilrekonstruktion bei großen Extremitätendefekten  
Orthopäde 23 (1994): 389-395

**Suzuki F.**

Effects of various growth factors on a chondrocyte differentiation model.  
Adv Exp Med Biol 324 (1992): 101- 106

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

Efficacy of perichondrium and a trabecular demineralized bone matrix for generating cartilage.

Plast Reconstr Surg 102 (1998): 2012-2020

**Van Osch G.J., Mandl E.W., Marijnissen W.J., van der Veen S.W., Verwoerd-Verhoef H.L., Verhaar J.A.**

Growth factors in cartilage tissue engineering.

Biorheology 39 (2002): 215-220

**Van Osch G.J., Van Der Veen S.W., Burger E.H., Verwoerd-Verhoef H.L.**

Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium

Tissue Eng 6 (2000): 321-330

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

Relationship between shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.

Nature 267 (1977): 531-532

**Vacanti C.A., Langer R., Schloo B., Vacanti J.P.**

Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation.

Plast Reconstr Surg 88 (1991): 753-759

**Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Freed L.E.**

Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage.

Biorheology 39 (2002): 259-268

**Waldman S.D., Spiteri C.G., Gryn timer M.D., Pilliar R.M., Hong J., Kandel R.A.**

Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro.

J Bone Joint Surg Am 85 (2003): 101-105

**Werner J.B.C.**

Die Neovaskularisation durch isolierte Arterien und Venen als implantierter Gefäßstiel im präfabrizierten Hautlappen: Experimentelle Untersuchung am Kaninchen.

Vet Med Diss LMU München (2000)

**Xia W.Y., Liu W., Cui L., Shang Q.X., Liu Y.C., Zhong W., Cao Y.L.**

The experimental study of tissue engineered autologous cartilage using chitosan-gelatin complex scaffolds

Zhonghua Yi Xue Za Zhi 83 (2003): 577-579

**Zhou Z.Y., Nichter L.S., West B.R., Navarrette P.M.**

Evaluation of a temporary arteriovenous shunt to establish neovascularization in a musculocutaneous flap: an experimental study.

Microsurgery 15 (1994): 63-69

## 11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. E. Biemer und Herr Dr. med. M. Klöppel danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die gute Betreuung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. vet. Dr. med habil. W. Ehrhardt, Frau Dr. med. vet. Henke und Herrn I. Pragst für die Unterstützung in der Behandlung und dem Umgang mit den Tieren.

Herrn Dr. rer. nat. Aigner und Herr Dr. med. Staudenmeier danke ich für die große Unterstützung und gute Betreuung.

Ich danke besonders Herrn Kai Kaye für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herr Dr. med. N. Hoang und Herrn Dr. vet. med. Werner für die Bereitstellung und geduldige Weitergabe ihres Wissens.

Dem Schwestern- Team aus der experimentellen Chirurgie im Krankenhaus Rechts der Isar der TU München danke ich für die freundliche Unterstützung.

Danken möchte ich gesamten Tierpflegerteam aus der gleichen Abteilung für die hervorragende Betreuung.

Meiner Frau Dr. vet. med. Erika Miehle danke ich für Ihre Geduld und hilfreichen Anstöße.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Nikolaus Miehle
Geburtsdatum	15.08.1973
Geburtsort	Wolfratshausen
Nationalität	Deutsch
Familienstatus	Verheiratet, 1 Tochter

## Ausbildung

1993	Abitur Schule Schloß Neubeuern
1993-1994	Sanitätsdienst im 1. Gebirgspionierbataillon 8 in Brannenburg
ab 1995	Studium der Medizin an der Ludwig- Maximillian-Universität (LMU) München
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## AIP/Assistenarzt

seit Oktober 2002	in der Abteilung Rheumatologie/klinische Immunologie der medizinischen Klinik der Universität Freiburg
April 2004	Approbation
November 1998- Juli 2000	Doktorand in der Abteilung für plastische und wiederherstellende Chirurgie im Klinikum rechts der Isar der Technischem Universität München