

**Orthopädische und Sportorthopädische Klinik und  
Poliklinik der  
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

**Kultivierung von Fibrochondrozyten in einem druckpulsierenden  
Bioreaktor**

**Ingolf Harald Askevold**

**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. Priv.-Doz. Dr. V. Martinek  
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel**

**Die Dissertation wurde am 16.07.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>S. 6</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>S. 7</b>
1.1 Zielsetzung	S. 7
1.2 Meniskus	S. 8
1.2.1 Anatomie	S. 8
1.2.2 Meniskuszusammensetzung	S. 10
1.2.2.1 Meniskuszellen	S. 10
1.2.2.2 Extrazelluläre Matrix	S. 11
1.3 Biomechanik des Meniskus	S. 13
1.4 Pathologien des Meniskus	S. 14
1.5 Meniskusheilung	S. 15
1.6 Meniskusregeneration	S. 16
1.7 Therapieoptionen	S. 16
1.8 Tissue Engineering	S. 17
1.8.1 Zelltyp	S. 18
1.8.2 Scaffolds – Trägermatrizes	S. 18
1.8.3 Kulturbedingungen	S. 19
1.8.3.1 Bioreaktoren	S. 20
1.8.3.2 Wachstumsfaktoren	S. 21
1.8.3.3 Gentransfer	S. 21
1.8.3.4 Physikalische Stimuli	S. 21
<b>2. Methode und Materialien</b>	<b>S. 23</b>
2.1 Materialien	S. 23
2.2 Zellkultur	S. 24
2.2.1 Gewinnung von Schafsmenisci	S. 24
2.2.2 Isolierung von Fibrochondrozyten	S. 24
2.2.3 Zellkultur	S. 25
2.2.4 Kryokonservation der Fibrochondrozyten	S. 26

2.2.5 Auftauen der kryokonservierten Fibrochondrozyten	S. 26
2.2.6 Kultur nach Auftauen	S. 27
2.2.7 Besiedelung von Scaffolds	S. 27
2.2.8 Kultivierung der besiedelten Scaffolds	S. 28
2.2.9 Kultivierung von Vergleichskulturen	S. 28
2.3 Bioreaktor DPR50	S. 29
2.3.1 Materialien	S. 29
2.3.2 Konstruktion Bioreaktor DPR50	S. 30
2.3.2.1 Hauptkammer	S. 30
2.3.2.2 Diffusor	S. 32
2.3.2.3 Trägergerüst	S. 34
2.3.3 Spezifikationen	S. 34
2.3.3.1 Druck	S. 34
2.3.3.2 Frequenz	S. 34
2.3.3.3 Temperatur	S. 35
2.3.3.4 PH	S. 35
2.3.3.5 Medium und Mediumflow	S. 35
2.3.4 Steuerungsprogramm	S. 35
2.3.5 Visualisierung der eingehenden Daten	S. 36
2.3.6 Bioreaktorkultur	S. 38
2.3.6.1 Bioreaktorzyklen	S. 38
2.3.6.2 Vorbereitung des Bioreaktors	S. 38
2.3.6.3 Bestückung des Bioreaktors	S. 39
2.4 Experimente	S. 42
2.4.1 Vorversuche	S. 42
2.4.1.1 Nachweis der Inertheit - Mediumkontrolle	S. 42
2.4.1.2 PH-Messung	S. 42
2.4.1.3 Temperaturkontrolle	S. 42
2.4.2 Experimente bei 2, 5 und 10 bar alternierendem Druck	S. 42
2.5 Analytik	S. 44
2.5.1 Histologie	S. 44
2.5.2 Glykosaminoglykan-Analyse	S. 44
2.5.2.1 Vorbereitung der Probe	S. 44
2.5.2.2 Blyscan Sulfated Glykosaminoglykan Assay	S. 44

2.5.3	Rekultivierung	S. 45
2.5.4	Vitalitätsprobe	S. 45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>S. 46</b>
3.1	Zellkultur	S. 46
3.2	Bioreaktor DPR50	S. 47
3.2.1	Kosten	S. 47
3.2.2	Technische Daten	S. 47
3.2.2.1	Druckverlauf	S. 47
3.2.2.2	Mediumaustauschrate	S. 48
3.2.2.3	Pressluftverbrauch	S. 48
3.2.2.4	Nachweis der Inertheit – Mediumkontrolle	S. 49
3.2.3	PH-Wert	S. 49
3.2.3.1	Vorversuche	S. 49
3.2.3.2	PH-Wert im Verlauf der Experimente	S. 50
3.2.4	Temperatur	S. 51
3.2.4.1	Heizplattenabhängigkeit der Bioreaktorkerntemperatur	S. 51
3.2.4.2	Temperatur im Verlauf der Experimente	S. 53
3.2.5	Zusammenfassung der Leistungsdaten des Bioreaktors DPR50	S. 54
3.3	Experimente	S. 55
3.3.1	Rekultivierung	S. 55
3.3.2	Vitalitätsprobe nach dem Tryptan blue Test	S. 56
3.3.3	Glykosaminoglykan-Analyse	S. 57
3.3.4	Histologie	S. 58
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>S. 62</b>
4.1	Zellkultur	S. 62
4.2	Bioreaktor	S. 62
4.2.1	Bedeutung eines Bioreaktors in der Zellkultur Temperatur	S. 62
4.2.2	Der neu entwickelte Bioreaktor DPR50	S. 63
4.2.2.1	Temperatur	S. 63
4.2.2.2	PH-Wert	S. 64

4.2.2.3	Kontaminationen	S. 64
4.2.2.4	Lärmbelastung	S. 64
4.2.2.5	Bauliche Frequenzlimitation des DPR50	S. 64
4.2.2.6	Materialermüdung	S. 65
4.3	Experimente	S. 66
4.3.1	Bedeutung der intermittierend hydrostatischen Druckpulsation - Stand der Forschung	S. 66
4.3.2	Das verwendete Druckregime	S. 67
4.3.3	Einfluss des Bioreaktors DPR50 auf Fibrochondrozyten	S. 67
4.3.2.1	Rekultivierung	S. 67
4.3.2.2	Vitalitätsprobe nach dem Trypan blue Test	S. 68
4.3.2.3	Glykosaminoglykan-Analyse	S. 68
4.3.2.4	Histologie	S. 68
4.3.4	Gründe für den beobachteten Zellrückgang	S. 69
4.4	Schlussfolgerung	S. 71
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S. 72</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>S. 74</b>
6.1	Gerätschaften	S.74
6.2	Verbrauchsmaterialien	S.75
6.3	Feste Kombinationen	S.76
6.4	Blyscan Sulfated Glycosaminglycan Assay, biocolor, Irland	S.77
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>S. 78</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>S. 86</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>S. 87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
kPa, MPa	Kilo-, Megapascal
Hz	Hertz
μl, ml, l	Mykro-, Milli-, Liter
mg, g	Milligramm, Gramm
min, h	Minuten, Stunden
MW	Mittelwert
n	Anzahl
SD	Standardabweichung
%	Prozent
° C	Grad Celcius

# **1. Einleitung**

## **1.1 Zielsetzung**

Meniskusverletzungen gehören zu den häufigen und schwierig zu behandelnden orthopädischen Erkrankungen. Gerade Läsionen des Meniskus stellen ein therapeutisch nicht befriedigend gelöstes Problem dar. Der Meniskus besteht größten Teils aus Faserknorpel [Drenckhahn 1994], der eine ungenügende bis keine Regenerationsfähigkeit besitzt. Schon kleine Verletzungen können dauerhafte Schmerzen verursachen und bereits bei jüngeren Patienten kann die Arthroseentstehung beschleunigt werden.

Je nach Verletzungsmuster stehen verschiedene Behandlungsoptionen zur Verfügung, unter anderem die Meniskusnaht, Teil-, Totalresektion und Meniskustransplantation. Bei ausgedehnten Verletzungen ist ein weiterer Therapieansatz die Implantation von Kollagenmatrices. Diese können zusätzlich mit autologen Fibrochondrozyten besiedelt werden [Buma 2004]. Problematisch hierbei ist vor allem die frühe Phase der Implantation, da die Fibrochondrozyten wenig adhärent und noch nicht von einer schützenden extrazellulären Matrix umgeben sind, wodurch auftretende Druckbelastungen nur schlecht kompensierbar sind. Bisher konnte in reiner *in vitro* Kultur eine nur unzureichende Produktion extrazellulärer Matrix beobachtet werden. Nach Arnoczky müssen die optimalen Kulturbedingungen für Meniskusgewebe erst noch etabliert werden [Arnoczky 1999].

Einige Studien belegen die Sensibilität von Chondrozyten gegenüber zugeführten physikalischen Belastungen [Ateshian 2003, Carver 1999, Hall 1991, Imler 2004, Mauck 2003]. Diese Belastung kann unter anderem aus statischen oder dynamischen Druck, Scherkräften oder hydrostatischen Druck bestehen. Diese Kräfte können mit Hilfe eines Bioreaktors *in vitro* erzeugt werden.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen druckpulsierenden Bioreaktor zu konstruieren, der physiologische Kulturbedingungen mittels intermittierend hydrostatischen Drucks simulieren kann.

Im zweiten Schritt soll untersucht werden, ob dieser physiologische Stimulus autologe Fibrochondrozyten *in vitro* zu einer gesteigerten extrazellulären Matrixproduktion anregt.

Dies kann eine der Voraussetzungen sein, die notwendig sind, auf dem Weg zu einem nicht immunogenen und suffizienten Meniskusersatz.

Zur Analyse der *in vitro* Kultur stehen histologische und biochemische Verfahren zur Verfügung.

## 1.2 Meniskus

### 1.2.1 Anatomie

Ursprünglich wurden die Menisci als funktionslose Reste der Beinmuskeln betrachtet, doch ist heute unbestritten, dass sie essentielle Funktionen im Bereich der Kraftaufnahme und -übertragung, als Gleitlager und zur Stabilisierung des Kniegelenkes ausüben [Buma 2004, Walker 1975].

Die Menisci sind C-förmige gebogene Halbringe von keilförmigem Querschnitt. Der Rücken dieses Keils liegt nach peripher und ist mit der Membrana synovialis der Gelenkkapsel verwachsen [Drenckhahn 1994]. Die proximale, dem Femur zugewandte, Meniskusoberfläche ist konkav geformt [McDevitt 1990]. Die distale Oberfläche, die in Kontakt mit dem Tibiaplateau steht, ist dagegen plan oder konvex [McDevitt 1990]. Dabei ist der laterale Meniskus mehr kreisförmig, seine Insertionsstellen liegen am Grunde der Eminentia intercondylaris. Der mediale Meniskus ist mehr halbmondförmig, seine beiden Enden kommen nicht so dicht zusammen, sondern umgreifen vorn und hinten die Haftstellen des lateralen Meniskus. Der mediale Meniskus ist außerdem mit dem hinteren Anteil des medialen Seitenbandes verbunden [Drenckhahn 1994]. Daraus resultiert eine geringere Verschieblichkeit des medialen Meniskus im Vergleich zum lateralen. Man teilt die Menisci in ein Vorderhorn, Hinterhorn und Pars intermedia ein.

Der Rücken des Meniskuskeils beträgt 3-5 mm und verjüngt sich in Richtung der zentralen Enden auf weniger als 0,5 mm. Die Breite des Keils auf Höhe der Pars intermedia beträgt ca. 12 mm. Dadurch können die Menisci die Inkongruenzen zwischen den runden Femurkondylen und den flachen bis konkaven Tibiaplateaus ausgleichen [Nägele 1995].

Die Menisci werden über inferiore und superiore Äste der Ae. geniculares lateralis und medialis versorgt (s. Abb. 1). Diese Äste bilden innerhalb des synovialen und kapsulären Gewebes des Kniegelenkes einen zirkulären perimeniskalen Plexus. Aus diesem versorgt ein radiär angeordnetes Gefäßnetz die peripheren Anteile des Meniskus. Zusätzliche Blutgefäße entstammen der Arteria genicularis media, die Teile der Synovia versorgt. Vaskulär versorgt werden so 10 bis 30 % des medialen und 10 bis 25 % des lateralen Meniskus [Arnoczky 1982; Arnoczky 1983]. Der Rest, die zentralen Anteile sind avaskulär und werden mittels Diffusion aus der Synovialflüssigkeit ernährt. Es wurden 10 bis 200 µm große Öffnungen beschrieben, die eine Diffusion auch in tiefere Meniskusschichten ermöglichen sollen (s. Abb. 2) [Bird 1988].

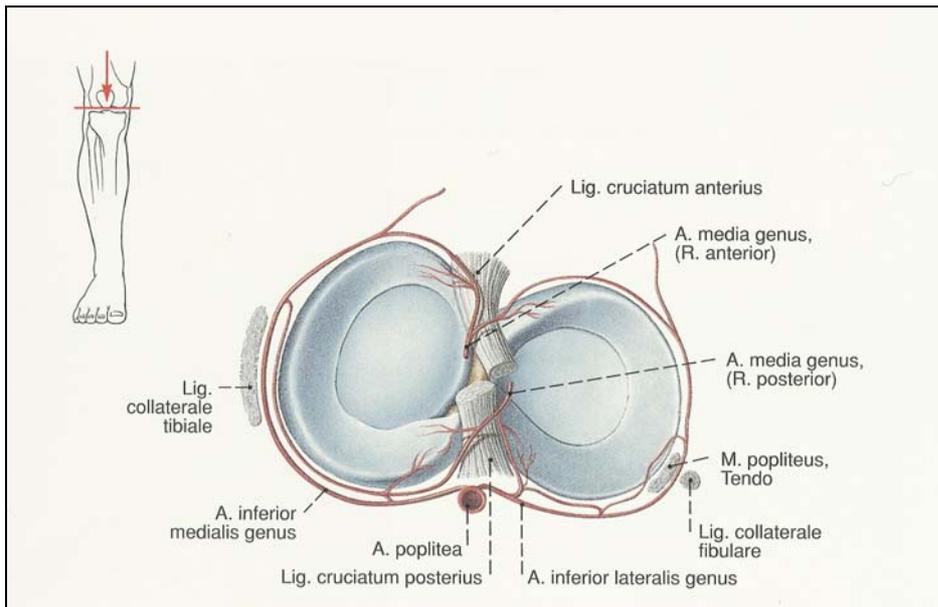


Abb. 1.1: Arterielle Gefäßversorgung der Menisci. Aus [Putz 2000]

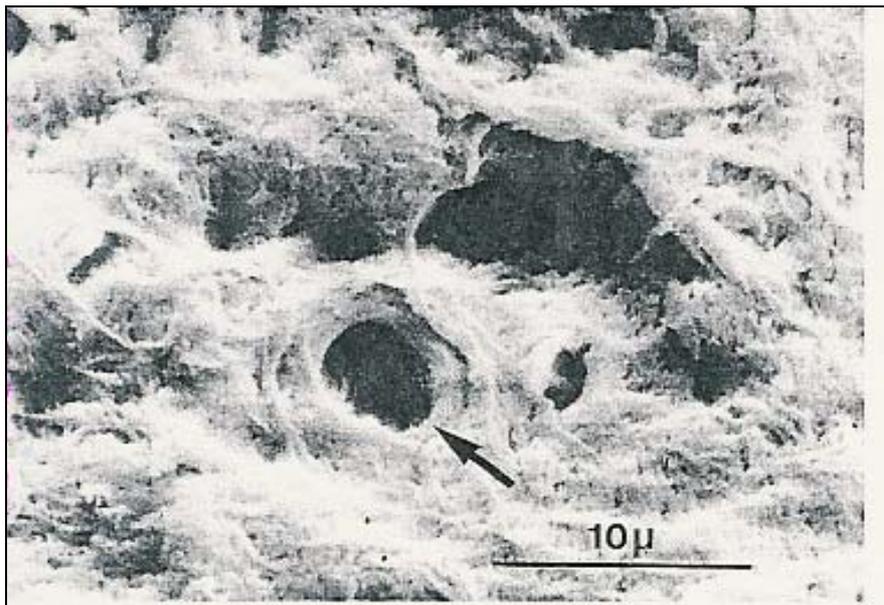


Abb. 1.2: Meniskuskanäle. Aus [Bird 1988]

Neuronale Strukturen innerhalb der Menisci wurden in mehreren Studien nachgewiesen [Zimny 1988; Day 1985]. Diese haben mechanorezeptive und propriorezeptive Eigenschaften. Das äußere Drittel und die Insertionen der Vorder- und Hinterhörner besitzen eine höhere Dichte an Nervenendigungen als die zentralen Anteile der Menisci. Ihnen wird eine wichtige afferente Funktion in der Propriozeption bei extremer Flexion oder Extension zugeschrieben [Rijk 2004].

Der Meniskus besteht überwiegend aus Faserknorpel. Faserknorpel hat Eigenschaften sowohl von dichtem Bindegewebe als auch von hyalinem Knorpel. Charakteristisch sind dichte Kollagenfaserbündel, zwischen denen einzelne Knorpelzellen oder kleine isogene Fibrochondrozytengruppen mit umgebendem Knorpelhof liegen. Häufig bilden die Fibrochondrozyten längere Säulen. Die Kollagenfaserbündel sind nach der vorherrschenden Druck- oder Zugrichtung angeordnet. Die meist kräftigen Kollagenfasern gehören überwiegend zum Typ I-Kollagen. Faserknorpel besitzt kein Perichondrium, sondern steht mit dem umgebenden dichten Bindegewebe in Verbindung, in das er allmählich übergeht [Schiebler 1996].

### 1.2.2 Meniskuszusammensetzung

Menisci enthalten ca. 75 % Wasser, 20 % Kollagen und einen kleinen Anteil an Zellen und Proteoglykanen. Typ I Kollagen macht mit 95 % den Hauptteil an dem Gesamtkollagen aus, aber es wurden auch die Kollagentypen II, III, V und VI nachgewiesen [Cheung 1987; McDevitt 1990].

Die Zusammensetzung ändert sich im Laufe des Lebens. So steigt der Kollagengehalt bis zum dreißigsten Lebensjahr an, bleibt dann bis zum achtzigsten nahezu konstant, um danach abzunehmen. Der Proteoglykangehalt nimmt von ca. 20 % nach der Geburt auf ca. 10 % im sechzigsten Lebensjahr ab [Ghosh 1987; Ingmann 1974].

#### 1.2.2.1 Meniskuszellen

Die vorherrschende Zellpopulation in den Menisci sind Fibrochondrozyten. Sie wurden so genannt, da ihre Form Chondrozyten entspricht und sie eine perizelluläre Matrix besitzen. Allerdings produzieren sie im Gegensatz zu Chondrozyten, die vorwiegend Typ II Kollagen exprimieren, hauptsächlich Kollagen Typ I, ähnlich Fibrozyten [Webber 1985; McDevitt 1990].

Fibrochondrozyten können weiter in eine tiefe und eine oberflächliche Subpopulation eingeteilt werden. Die oberflächlichen Fibrochondrozyten sind oval oder fusiform und besitzen nur wenige kurze Zellausläufer. Das reduzierte Zytoplasma lässt die Nuklei dieser Zellen groß und prominent erscheinen.

Tiefe Fibrochondrozyten sind meistens eher rund und besitzen einige Zellausläufer.

Beide Populationen besitzen reichlich Endoplasmatisches Reticulum und ein ausgeprägtes Golgi-Organ. Mitochondrien sind spärlich sichtbar, was darauf hinweist, dass Fibrochondrozyten hauptsächlich anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung verwenden [McDevitt 1990].

Neben Fibrochondrozyten können in den vaskularisierten Meniskusabschnitten auch Endothelialzellen und Mastzellen nachgewiesen werden [Heinegard 1989]. Des Weiteren können neuronale Strukturen belegt werden [Zimny 1988; Day 1985].

#### 1.2.2.2 Extrazelluläre Matrix

Das Meniskusgewebe besteht, je nach Alter, zu etwa 75 % aus Wasser. Vorherrschende Makromoleküle können eingeteilt werden in Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine und Elastin.

##### Kollagene

Kollagene machen etwa 60 bis 70 % der Trockenmasse aus. Hiervon sind ca. 90 bis 95 % dem Kollagen I zuzuordnen. Durch verbesserte Nachweismethoden konnten auch kleinere Mengen der Kollagene Typ II, III, V und VI belegt werden. Kollagen Typ I kommt dabei im ganzen Meniskus vor, Typ II dagegen nur in den zentralen, nicht vaskularisierten Anteilen. Die verschiedenen Kollagene verleihen dem Meniskus seine Zugfestigkeit. Die Kollagene sind des Weiteren wichtig für die Zellverknüpfung und in der Organisation der extrazellulären Matrix. Der Meniskus besteht aus drei Lagen Kollagenfasern. Dabei sind die Fasern entsprechend der vorherrschenden Beanspruchung angeordnet. Die oberste Schicht besteht aus Fasern ohne gerichtete Struktur. Die tiefe Schicht besteht aus Fasern, die hauptsächlich zirkulär angeordnet sind und von wenigen radiär verlaufenden Faserzügen, so genannten tie fibers, gekreuzt werden. Dazwischen liegt eine lamellare Schicht, deren Fasern in Anteilen der anterioren und posterioren Zone vorwiegend radiär geschichtet sind, in den restlichen Anteilen jedoch ohne gerichtete Struktur verlaufen (s. Abb. 3)[McDevitt 1990; Sweigart 2001].

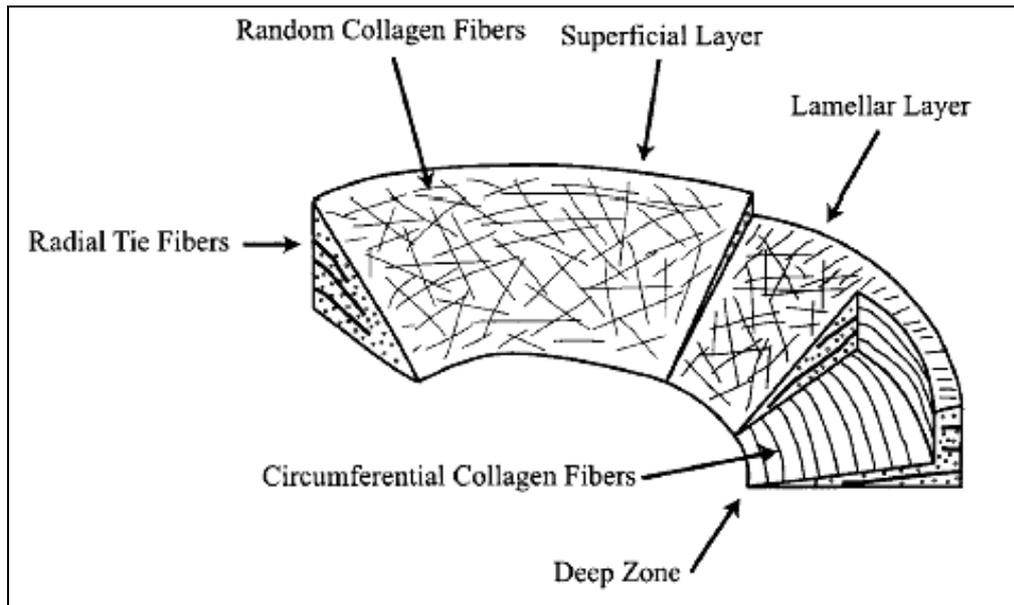


Abb. 1.3: Kollagenanordnung im Meniskus. Aus [Sweigart 2001]

### Proteoglykane

Proteoglykane sind für das Wasserbindungsvermögen und die viskoelastischen Eigenschaften des Meniskus unentbehrlich. [Sweigart 2001] Sie setzen sich aus Peptidketten zusammen, an die kovalent Polysaccharidseitenketten geknüpft sind. Sie besitzen ein einfaches Proteinskelett oder auch Core-Protein, an das lange Heteroglykanketten gebunden sind. Diese Heteroglykanketten sind vornehmlich aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaut, bestehend aus einem Hexosamin (Glucosamin oder Galaktosamin) und einem stickstofffreien Monosaccharid, meist Glucuronsäure. Proteoglykane können aufgrund der Größe und Frequenz ihres Proteinskeletts und der Größe und Beschaffenheit ihrer Glykosaminoglykanseitenketten weiter in zwei Gruppen eingeteilt werden. Erstens in große aggregierende Proteoglykane und zweitens in kleine nichtaggregierende Proteoglykane. Den großen Proteoglykanen sind viele (97) Chondroitin-Sulfat- und (30) Keratan-Sulfat-Ketten angeheftet. Durch die Anhäufung negativer Ladungen haben sie einen ausgeprägten polyanionischen Charakter und können so nichtkovalente Verbindungen mit Hyaluronsäure eingehen. Außerdem sind sie in der Lage, Wasser aber auch andere Moleküle reversibel zu binden und leisten damit einen wichtigen Beitrag für die viskoelastischen Funktionen des Meniskus. Kleine Proteoglykane bestehen dagegen aus einem kurzen Protein-Core und ein bis zwei kurzen Dermatan- oder Chondroitin-Sulfat-Seitenketten. Dermatanketten gehen Verbindungen mit Kollagen Typ I und Typ II ein. Ihre genauere Bedeutung ist noch Gegenstand der Forschung [McDevitt 1990; Heinegard 1989; Löffler 1998].

## Matrixglykoproteine

Es konnten zahlreiche weitere Matrixproteine, wie Fibronectin und Thrombospondin aus dem Meniskus isoliert werden. Des Weiteren wurden Link-Proteine, die das Proteoglykan-Hyaluronsäure-Aggregat stabilisieren, und ein 116 000 Dalton schweres Matrixprotein, dessen Bedeutung noch unklar ist, nachgewiesen [Fife 1985; McDevitt 1990].

## Elastin

Elastin stellt mit 0,6 % des meniskalen Trockengewichts nur einen kleinen Teil der kollagenen Proteine dar. Elastin besitzt einen hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, die Verbindungen mit Kollagenen und Glykoproteinen eingehen und elastische Fasern bilden. Diese Fasern sind wichtig zur Formerhaltung des Meniskus. [Ghosh 1987]

### **1.3 Biomechanik des Meniskus**

Der Meniskus ist Kompressions-, Zug- und Scherkräften ausgesetzt.

Die Kontaktfläche des Meniskus variiert je nach Kniestellung und –belastung. Bei 0° Flexion ist die Fläche maximal und sinkt durch eine Verschiebung des Meniskus bei steigender Kniebeugung. Dabei wird der Meniskus komprimiert und durch seine Keilform und der Form der Femurkondylen nach dorsal aus dem Zentrum verschoben, es entstehen Scherkräfte. Durch seine Fixierung an der anterioren und posterioren Anheftstelle tritt Zugbelastung innerhalb des Meniskus auf. Sie bilden also eine verformbare Ergänzung der Pfanne, sie schieben sich als Pfeile in den Gelenkspalt ein und vergrößern damit in allen Stellungen des Kniegelenks das Berührungsfeld der Gelenkkörper [Drenckhahn 1994].

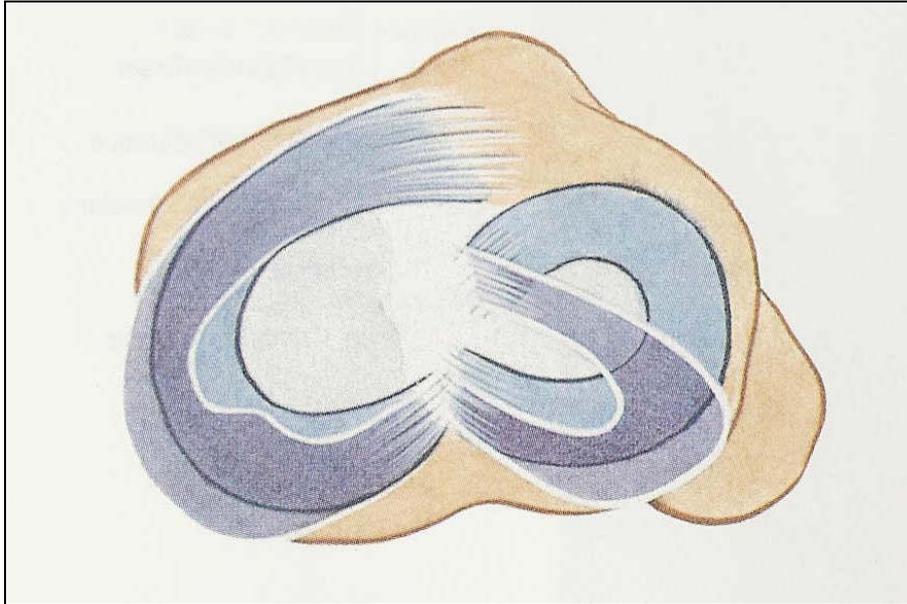


Abb. 1.4: Verschieblichkeit der Menisci bei Flexion.

Menisci in Streckstellung blau, in Beugestellung violett. Aus [Putz 2000]

#### 1.4 Pathologien des Meniskus

Krankhafte Veränderungen des Meniskus können verschiedene Ursachen haben. Es treten kongenitale Anomalien, entzündliche und metabolische Veränderungen sowie Neoplasmen und Traumata auf [Hough 1990].

Angeborene Anomalien treten am häufigsten in Form eines kompletten oder inkompletten Scheiben- oder Diskusmeniskus auf. Von dieser Formvariante ist häufiger der Außenmeniskus als der Innenmeniskus betroffen. Seltener tritt eine Ringformanomalie auf [Herman 1984; Nägele 1995].

Bakterielle Entzündungen des Meniskus treten, bedingt durch seine Faserknorpelstruktur, seltener auf als bei den umgebenen hyalinen Gelenkflächen des Kniegelenkes [Hough 1990]. Eine Beteiligung der Menisci bei der rheumatoiden Arthritis ist nicht ungewöhnlich und kann bis zu ihrer vollständigen Zerstörung führen [Hough 1989].

Chondrokalzinose ist die wichtigste metabolische Erkrankung, die zu einer Affektion der Menisci führt [Hough 1990]. Es kommt dabei zu Kalziumpyrophosphat-Kristallablagerungen innerhalb des Meniskus [Ryan 1989].

Primäre Neoplasien des Meniskus wurden bisher noch nicht beschrieben, gleichwohl tritt gelegentlich eine sekundäre Beteiligung, zum Beispiel bei synovialer Chondromatose oder Sarkomen auf [Hough 1990].

Rupturen des Meniskus treten einerseits nach Traumata, andererseits im Rahmen degenerativer Veränderungen auf. Übermäßige Scherkräfte auf ein gesundes Kniegelenk, die bei Rotation des Kniegelenkes bei fixiertem Unterschenkel, zum Beispiel beim Fußballspielen oder Skifahren entstehen, führen meist zu Längs- bzw. Radiärissen. Eine Sonderform des Längsrisses ist der Korbhenkelriss, bei dem es zu einer Dislokation des Einrisses in das Gelenk kommt. Eher zu Quer- bzw. Tangentialrissen neigen degenerativ vorgeschädigte Menisci. Die Ruptur hierbei tritt in der Regel schon bei geringen Belastungen auf.

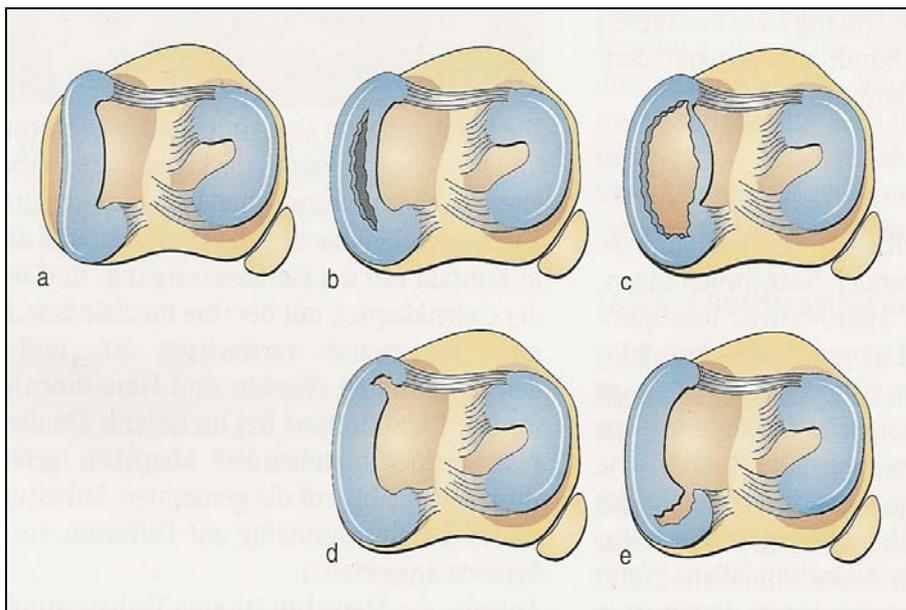


Abb. 1.5: Rissformen der Menisci aus [Rösler 2000].

- a) Ablösung der Meniskusbasis am Kapselrand
- b) Längsriss im Meniskuskörper ohne Dislokation
- c) Korbhenkelriss; Längsriss mit Dislokation
- d) Querriss im Vorderhorn
- e) Lappenriss im Hinterhorn

## 1.5 Meniskusheilung

Dem Meniskus wird eine sehr schlechte Spontanheilungstendenz zugesprochen. Verletzungen in der avaskulären Zone heilen in der Regel nicht [King 1936]. Lange Zeit galten auch vaskularisierte Bereiche als nicht regenerationsfähig. Es wurde mittlerweile jedoch bewiesen, dass Fibrochondrozyten, die in Kontakt mit chemotaktischen und mitogenen Zytokinen kommen, proliferieren, Matrix produzieren und in eine Meniskuswunde einwandern können. Diese Zytokine sind in einem Wundhämatom enthalten [Webber 1989]. Radiärrupturen können unter Wiedererlangung der biomechanischen Eigenschaften heilen.

Tangentialrupturen hingegen, bei denen die zirkulären Fasern unterbrochen sind, führen in der Regel zu einem Qualitätsverlust [Newmann 1989]. Experimentell therapeutisch versucht man sich dieses Wissen nutzbar zu machen, indem man zum Beispiel die avaskuläre Region mit der vaskularisierten Zone verbindet. Damit wird ein Fibringerinnsel geschaffen, das zum einen Zytokine freisetzt, zum anderen als Platzhalter fungiert [Arnoczky 1983; Sethi 2003]. Ein weiterer, im Experiment erfolgversprechender Ansatz ist es, Wachstumsfaktoren in Kombination mit der Vaskularisierung einzusetzen [Arnoczky 1988].

## **1.6 Meniskusregeneration**

Bei Exzision des Meniskus in der vaskularisierten Zone kommt es zur Ausbildung eines dem Meniskus ähnlichen Regenerates [Burr 1982; Klopemaker 1996]. Dieses Regenerat ist biomechanisch allerdings insuffizient. Ein nach Meniskektomie entstandenes Regenerat kann die Ausbildung einer Gonarthrose nicht verhindern und ist von keiner klinischen Bedeutung.

## **1.7 Therapieoptionen**

Die Behandlung nach Meniskusläsionen ist ein bisher nicht optimal gelöstes Problem in der Orthopädie. Grundsätzlich muss versucht werden den Meniskus zu erhalten, da jede Meniskektomie, auch die Teilmeniskektomie, die Entwicklung einer Gonarthrose beschleunigt [Cox 1975]. Derzeit gibt es verschiedene Behandlungskonzepte, nämlich die Meniskusnaht, Teil- bzw. Totalresektion, die Transplantation eines Kadaver-Meniskus (Allograft) und die Implantation eines künstlichen Ersatzmeniskus (Collagen Meniscus Implantat). Alle Behandlungsmethoden stellen keinen vollwertigen Ersatz eines geschädigten Meniskus dar.

Mittels der rekonstruktiven Verfahren können nur frische basisnahe tangentielle Rupturen bei jüngeren Patienten mit Erfolg genäht werden. Es stehen die Meniskusnaht oder die Meniskusnagelung zur Verfügung. Hierbei werden im ersten Schritt die Wundränder aufgefrischt, das so genannte Meniskustrimming. Dadurch werden Gefäße eröffnet. Dies soll zu einer verbesserten Nährstoff und Wachstumsfaktoren-Versorgung führen. Im zweiten Schritt erfolgt eine U-förmige Naht oder die Rupturstelle wird mit resorbierbaren Pfeilen (Arrows, Biofix) fixiert.

Die Meniskektomie stellt eine weitere Therapieoption dar. Allerdings belegte TJ Fairbanks schon 1948, dass es nach Meniskektomie gehäuft zu degenerativen Arthritiden kommt, was

seitdem mehrfach durch klinische und experimentelle Ergebnisse bestätigt wurde [Fairbanks 1948; Allen 1984; Moskowitz 1973, Lanzer 1990, Arnoczky 1990, van Arkel 1995; Collier 1995, Jackson 1992]. Daher wird, wenn möglich eine sparsame Teilresektion durchgeführt und nur bei ausgedehnten Rupturen findet eine komplette Meniscektomie statt.

Bei Allografttransplantaten bestehen noch ungelöste Probleme hinsichtlich der Lagerung und Konservierung, dem Risiko der Krankheitsübertragung und immunologischen Abwehrreaktionen des Empfängers, die zu Implantatverkalkungen führen können [Hamlet 1997; van Arkel 1995; de Boer 1994].

Das Collagen Meniskus Implantat (CMI) ist eine aus Rinderachillessehnen gewonnene Kollagenmatrix, die überwiegend aus Kollagen Typ I besteht. Durch einwachsende Zellen in diese Matrix sollen die biomechanischen und biophysikalischen Eigenschaften soweit verbessert sein, dass es zu keiner weiteren Arthrosebildung kommt [Stone 1992; Stone 1997; Rodkey 1999]. Das CMI ersetzt beschädigtes Gewebe. Darüber hinaus ist es nicht notwendig gesundes Gewebe zu resezieren. Erste positive Ergebnisse über einen Zeitraum von ca. 6 Jahren wurden von Steadman 2005 veröffentlicht, allerdings mit einer sehr kleinen Fallzahl (n=8) [Steadman 2005]. Weitere Langzeitergebnisse stehen noch aus.

## **1.8 Tissue Engineering**

R. Langer und J.P. Vacanti definierten 1993 das Tissue Engineering in der Zeitschrift Science folgendermaßen: Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet, welches die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften für die Entwicklung biologischer Implantate nutzt, die die Gewebefunktion wiederherstellen, erhalten oder verbessern [Langer 1993].

Eine Unterform des tissue engineering, das sogenannte functional tissue engineering, untersucht darüber hinaus den Einfluss physiologischer Kulturbedingungen auf das Gewebe [Hung 2004; Klopemaker 1996].

Möglicherweise gelingt es durch functional tissue engineering einen künstlichen Meniskus zu entwickeln und in die Therapie der Meniskuserkrankungen zu integrieren. Die Auswahl eines geeigneten Zelltyps, des verwendeten Scaffolds und der Kulturbedingungen sind hierbei wichtige Faktoren. Die Kulturbedingungen können unter anderem durch eine Modulation des verwendeten Mediums, der Temperatur, des pH und der physikalischen Stimuli beeinflusst werden.

### 1.8.1 Zelltyp

Grundsätzlich kommen drei Zellarten als mögliche Ausgangsquelle für einen Meniskusersatz in Betracht: meniskale Fibrochondrozyten, pluripotente Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen. Stammzellen können sich in Fibrochondrozyten differenzieren und dann Faserknorpelmatrix produzieren. Der Weg der Differenzierung wird durch ein komplexes Zusammenspiel von biochemischen und biophysikalischen Faktoren geleitet. Biochemische Faktoren sind z.B. Wachstumsfaktoren und Botenstoffe, biophysikalische Faktoren sind z.B. die Sauerstoffkonzentration und physikalische Stimuli [Barry 2003; Setton 1999]. Fibroblasten spielen bei der endogenen Meniskusheilung eine Rolle. Sie wachsen aus der umgebenen Synovia ein und bilden ein fibrovaskuläres Ersatzgewebe. Allerdings ist dieser Ersatzknorpel dem genuinen Meniskusknorpel biochemisch und biomechanisch nicht gleichwertig [Arnoczky 1983; Arnoczky 1988 ;Klopemaker 1996]. Fibrochondrozyten können auf chemotaktische und mitogene Reize reagieren, sind zur Migration fähig und können extrazelluläre Matrix produzieren. Außerdem stellen sie die Majorität der gesunden Meniskuszellen. Daher erscheinen sie S.P. Arnoczky, für das tissue engineering, besonders geeignet zu sein [Arnoczky 1999]. Alle drei Zellreihen sind Gegenstand der derzeitigen Forschung [Arnoczky 1999].

### 1.8.2 Scaffolds - Trägermatrizes

Um die Meniskuszellen kultivieren zu können, ist eine Matrix erforderlich, in die Zellen eingebracht werden können. Diese Matrix muss den Zellen ein uneingeschränktes Wachstum ermöglichen. Des Weiteren muss eine freie Diffusion von Nährstoffen und Abbauprodukten gewährleistet sein. Es sollte stabil genug sein, um physikalische Kräfte auszuhalten und sich nach Arnoczky 1999 möglichst nach erfolgreicher Kultivierung ohne Abgabe toxischer Substanzen auflösen und dabei biokompatibel sein. Synthetische Scaffolds bestehen meist aus Kollagenen, Agarose oder Polymeren. Sie variieren in ihrer Substanz, z.B. liegen sie als Gel oder Schwamm vor, ihrer Struktur, z.B. Dichte und Porosität und ihren mechanischen Eigenschaften wie z.B. Steifigkeit und Elastizität [Arnoczky 1999; Vunjak-Novakoviv 2003].

### 1.8.3 Kulturbedingungen

#### 1.8.3.1 Bioreaktoren

Zellen brauchen für ein optimales Wachstum Kulturbedingungen, die streng kontrolliert sind. Dazu dienen Bioreaktoren. Je nach Bauweise können sie beispielsweise die Temperatur, pH-Wert, Mediumfluß, Kohlenstoffdioxid und Sauerstoffpartialdruck regulieren. Für das functional tissue engineering sind darüber hinaus Bioreaktoren notwendig, die zusätzlich physikalische Kräfte simulieren können. So werden zum Beispiel Scherkräfte, mechanischer Druck oder Kompression erzeugt. Die Funktionsweise gängiger Bioreaktoren ist in Abb. 6 und deren Leistungsdaten in Tab. 1 dargestellt.

Diese Bioreaktoren werden in Inkubatoren betrieben, um Temperatur, pH-Wert und Partialdrücke zu regulieren. Ein Mediumwechsel ist diskontinuierlich möglich. Dynamische Bioreaktoren bieten einige Vorteile gegenüber statischen. So wird der Nährstoffaustausch bei statischen Bioreaktoren allein durch langsame Diffusion bewerkstelligt. Bei dynamischen Bioreaktoren erfolgt der Nährstofftransport zusätzlich durch den Mediumfluss. Dynamische Bioreaktoren erzeugen darüber hinaus Querkräfte, die als Wachstumssignale gelten. Auch mechanischer Druck gilt als solch ein Wachstumssignal [Davisson 2002; Ikenoue 2003; Carver 1999].

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, einen Bioreaktor zu konstruieren, der einen druckpulsierenden Stimulus ausüben kann. Auf einen zusätzlichen Inkubator soll nach Möglichkeit verzichtet werden. Temperatur und pH-Wert müssen daher am Bioreaktor justiert werden können. Druck- und Temperaturverlauf sollen kontinuierlich aufgezeichnet werden. Weiterhin soll es möglich sein, das Medium semikontinuierlich zu wechseln.

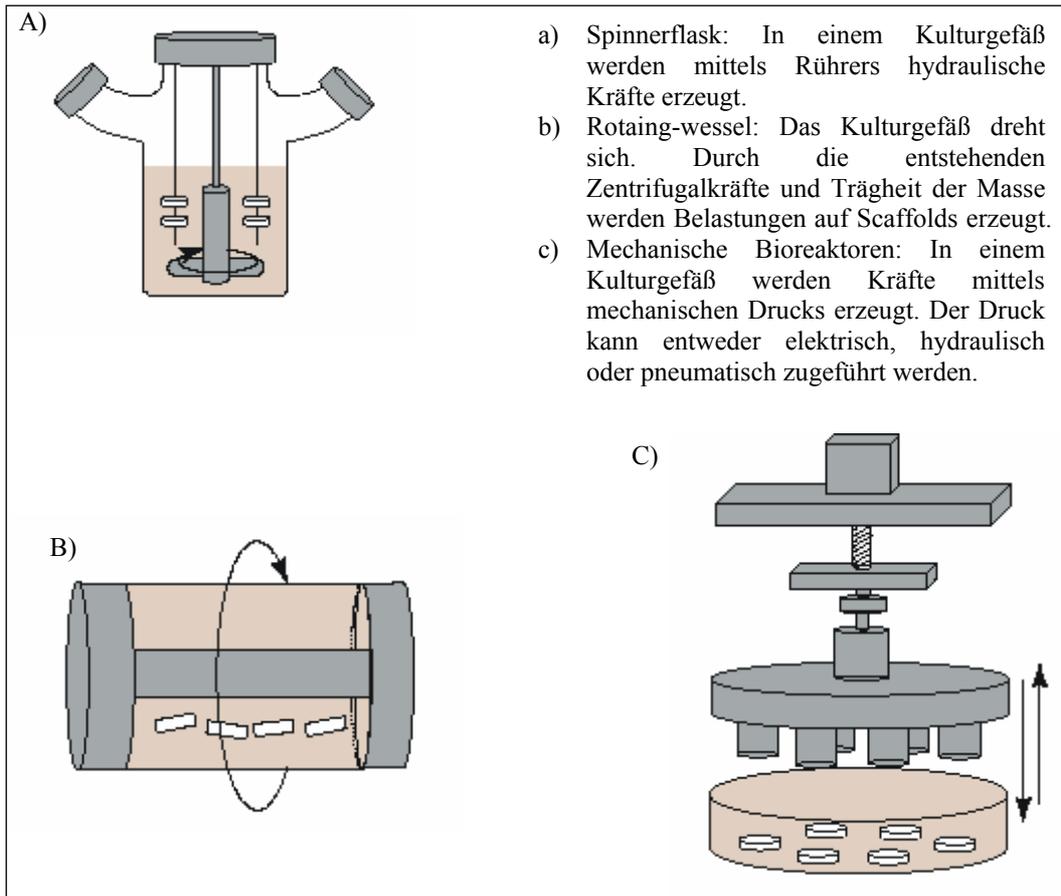


Abb. 1.6: Bioreaktoren im Vergleich. Modifiziert nach [Martin 2004]

Bioreaktor	Mixed Flask	Rotating vessel	Mechan. Bioreaktor
Mechanismus	Magnetisch	Elektrisch	Elektrisch, hydraulisch, pneumatisch
Gewebestücke n	12	12	6-12
Mediumaustausch	Batch-wise	Batch-wise	Batch-wise/ semikontinuierlich
Druck	Kontinuierlich	Kontinuierlich	Dynamisch

Tab. 1.1: Bioreaktoren im Vergleich. Nach [Martin 2004]

### 1.8.3.2 Wachstumsfaktoren

Wachstums- und Differenzierungsvorgänge werden in vivo unter anderem durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren gesteuert. Zytokine sind Gewebshormone. Sie werden von ortsständigen Zellen wie Endothel- und Mesenchymzellen exprimiert. Auch Entzündungszellen wie Makrophagen und Monozyten können Zytokine freisetzen. Zytokine steuern die Proliferation, Migration und Aktivität der Gewebezellen. Auch eine weitere Differenzierung der Zellen wird über Zytokine gesteuert. Bisher wurden über 45 verschiedene Zytokine isoliert, deren Wirkung auf den Meniskus noch Gegenstand der Forschung ist. So hat S. Martinek die Wirkung humaner Wachstumsfaktoren auf humane Meniskuszellen untersucht und konnte für TGF- $\alpha$  und teilweise für VEGF eine signifikante Steigerung der Proliferation nachweisen [Martinek S. 2001]. Des Weiteren gilt TGF- $\beta$  als wirksamer Stimulator der Glykosaminoglykansynthese und PDGF als Stimulator der Proliferation [Collier 1995; Buma 2004].

### 1.8.3.3 Gentransfer

Die Gewebedifferenzierung und Matrixproduktion kann auch mittels genetic engineering beeinflusst werden. V. Martinek et al. zeigten, dass es möglich ist, ex vivo allograft Menisci mit viralen Vektoren zu transfizieren. Die Genexpression der Markergene lacZ, luciferase und green fluorescence protein konnte über vier Wochen in vitro nachgewiesen werden. In vivo konnten transduzierte Zellen über einen Zeitraum von acht Wochen nachgewiesen werden [Martinek 2002]. Diese Ergebnisse konnten von anderen Forschungsgruppen bestätigt werden [Goto 1999]. Durch Modulation verschiedener Gene, wie der Gene für Wachstumsfaktoren, kann möglicherweise die Proliferation und Matrixproduktion der Zellen gezielt gesteuert werden.

### 1.8.3.4 Physikalische Stimuli

In der Entwicklung des Bewegungsapparates spielen mechanische Kräfte eine große Rolle. So entwickelt und differenziert sich der Meniskus in der Embryogenese unter anderem durch die kindlichen Beinbewegungen [Buma 2004]. Auch während des Wachstums und Alterungsprozesses kommt es, wie unter 1.2.2 beschrieben, unter anderem durch mechanische Reize zu einer Änderung der Meniskuszusammensetzung. Dabei ist der Meniskus

verschiedenen physikalischen Kräften ausgesetzt. Zum einen tritt Kompression auf. Bei jedem Schritt werden durch das Körpergewicht die Menisci zusammengedrückt. Außerdem treten Scherkräfte bei der Gleitbewegung der Menisci über die Gelenkflächen auf. Diese Kräfte versucht man beim functional tissue engineering zu simulieren. Bisher fokussieren sich viele Studien auf das hyaline Knorpelgewebe der Gelenkflächen. So konnte durch Li et al. gezeigt werden, dass statischer Druck von 84 kPa über 24 h zu einer Abnahme des GAG-Gehaltes in Knorpelgewebe führt. Dagegen führt eine dynamische Belastung mit 200 kPa bei 0,01 Hz zu einer 20 %igen Zunahme [Li 2001]. Carver et al. beschrieben bei intermittierender Kompression bei 3,44 MPa keine Zunahme der Kollagensynthese. Dagegen fanden sie bei 6,87 MPa eine gesteigerte Kollagensynthese. Bei beiden Drücken konnte die GAG-Synthese gesteigert werden [Carver 1999]. Ikenoue et al. zeigte für 1,5 und 10 MPa bei einer Frequenz von einem Hz, dass intermittierender Druck über vier Stunden an vier aufeinander folgenden Tagen die Expression von collagen-mRNA und somit die Kollagensynthese steigern kann [Ikenoue 2003]. Guilak et al sehen in der weiteren Erforschung des Parameters Druck einen Erfolg versprechenden Ansatz für das functional tissue engineering. Ein besseres Verständnis des modulierenden Einflusses mechanischer Kräfte kann zu einer Verbesserung in vitro hergestellter Knorpelimplantate führen [Guilak 2001].

## **2. Methoden und Materialien**

### **2.1 Materialien**

Die einzelnen verwendeten Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien sind in Anhang 6.1 Gerätschaften und 6.2 Verbrauchsmaterialien zusammen gefasst. Wiederholt eingesetzte feste Kombinationen wie das Nährmedium sind in Anhang 6.3. Feste Kombinationen aufgeführt.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Gewinnung von Schafsmenisci

Im Rahmen dieser Studie werden Fibrochondrozyten von Schafsmenisci eingesetzt. Es handelt sich bei den Schafen um Versuchstiere, welche im Rahmen einer anderen Studie zum tissue engineering geopfert werden. Es sind Merinoschafe mit einem durchschnittlichen Altern von 8 Jahren. Bei der Opferung können steril Menisci gewonnen werden, die mit Nährmedium überschichtet maximal zwei Stunden bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

### 2.2.2 Isolierung von Fibrochondrozyten

Zur Isolierung der Fibrochondrozyten wird ein modifiziertes Verfahren nach Green angewendet (Green, 1971). Alle angeführten Schritte zur Zellisolierung werden unter sterilen Kautelen ausgeführt.

Die in Kompletmedium I aufbewahrten Menisci werden in eine 10 cm Petrischale mit 5 ml Kompletmedium I überführt und dort in ca. 1 mm x 1 mm große Stücke mechanisch zerkleinert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation des mechanisch zerkleinerten Meniskus mit 20 ml Trypsin in einem 50 ml Tube bei 37° C über 15 Minuten in einem Wärmeschrank mit eingebauter Rüttelplatte bei 120 U/min. Das Trypsin erhöht die Wasserpermeabilität des Meniskus, dadurch wird die Effektivität der folgenden Schritte erhöht. Die eingesetzte Collagenase A arbeitet auf Wasserbasis, es können somit auch innerhalb des Meniskus wirksame Konzentration der Collagenase A erreicht werden. Eine fünfminütige Zentrifugation bei 900 U/min und 37° C folgt. Der Trypsinüberstand wird nach jetzt insgesamt 20 minütiger Einwirkzeit abgesaugt und die Zellen mit einem Kollagenase-Mediumgemisch in Suspension gebracht. Nach 12 h bei 37° C im Wärmeschrank wird diese Suspension mit 900 U/min und 37° C drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 25 ml Komplet-Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wird die Zahl der gelösten Zellen ermittelt. Die Suspension wird in Portionen von ca. 5 Mio. Zellen aufgeteilt und in große Zellkulturflaschen mit insgesamt 35 ml Kompletmedium I gefüllt.

### 2.2.3 Zellkultur

Die Kultivierung der Fibrochondrozyten erfolgt in einem Inkubator bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und mit Wasserdampf gesättigter Luft.

Die Adhäsion der Fibrochondrozyten am Boden der Zellkulturflasche und deren Zelldichte wird täglich mikroskopisch kontrolliert. Der erste Mediumwechsel erfolgt in der Regel am dritten Zellkulturtag. Mit Hilfe einer sterilen Glaspipette wird der Mediumüberstand abgesaugt und der Zellrasen mit 20 ml frischen Komplettmedium I erneut überschichtet. Im weiteren Verlauf wird durchschnittlich jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

Bei Konfluieren der Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche werden die Zellpopulationen im Verhältnis 3:1 gesplittet. Nach Absaugen des Überstandes und Spülung mit 20 ml PBS wird der Zellrasen mit 4 ml Trypsin überschichtet. Hierdurch lösen sich die adhärenen Zellen vom Flaschengrund ab. Dieser Vorgang wird mikroskopisch kontrolliert. Nach vollständigem Ablösen wird durch Zugabe von 14 ml Komplettmedium I die Trypsinwirkung aufgehoben. Die 18 ml Zellsuspension werden auf drei Zellkulturflaschen mit je 6 ml verteilt und jeweils mit 19 ml Komplettmedium I aufgefüllt.

Nach mikroskopischer Kontrolle werden die Fibrochondrozytenkulturen ein zweites Mal gesplittet.

Das Wachstum der einzelnen Fibrochondrozytenzelllinien wird laufend mikroskopisch kontrolliert und dokumentiert.

Tag 0: Menishektomie, Isolierung und Kultur
Tag 3: Mediumwechsel
Tag 5: Splitten 1:3
Tag 7: Mediumwechsel
Tag 9: Splitten 1:3
Tag 11: Mediumwechsel
Tag 13: Mediumwechsel
Tag 15: Kryokonservation

Tab. 2.1: Durchschnittliches Zeitschema der Zellkultur

#### 2.2.4 Kryokonservation der Fibrochondrozyten

Zur Anlage einer Zellbank werden die Fibrochondrozytenpopulationen kryokonserviert. Nach einem Kultivierungszyklus aus zweimaligem Splitten und anschließender Weiterkultivierung bis zu einer ausreichenden Zellrasendichte erfolgt das standardisierte Einfrieren.

Hierzu wird das Medium der Zellkulturflaschen abgesaugt, mit 20 ml PBS gespült und nochmals abgesaugt. Anschließend werden mit 4 ml Trypsin die Zellen vom Flaschengrund gelöst. Mit zusätzlichen 4 ml Komplettmedium I wird die Zellsuspension aus der Flasche in ein 50 ml Tube überführt. Die Zellzahl wird mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Nach Zentrifugation mit 900 U/min über drei Minuten wird der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird in einer Solution aus 50 % DMEM und 50 % FCS so in Lösung gebracht, dass eine Zellkonzentration von 4 Mio. Zellen pro ml entsteht. Diese Zellsuspension wird in Portionen zu 0,5 ml in vorgekühlte Kryoampullen pipettiert. Mit 0,5 ml einer eisgekühlten Solution aus 50 % FCS, 30 % DMEM und 20% DMSO werden die Kryoampullen auf 1 ml gefüllt. In den Ampullen befindet sich somit eine Zellkonzentration von 2 Mio. Zellen pro ml. Die Ampullen werden verschlossen und in einem Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.5 Auftauen der kryokonservierten Fibrochondrozyten

Bei Bedarf können Zellen der Zellbank ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) entnommen und aufgetaut werden. Zellkulturflaschen werden mit 20 ml Komplettmedium I gefüllt. Die tiefgefrorenen Zellportionen werden in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  über 10 min erwärmt. Nach dem Auftauen werden die Zellsuspensionen zügig in die Zellkulturflaschen überführt und in den Inkubator gestellt.

## 2.2.6 Kultur nach Auftauen

Die Kultivierung der aufgetauten Fibrochondrozyten erfolgt in einem Inkubator bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und mit Wasserdampf gesättigter Luft. Nach Absetzen der Zellen auf den Flaschengrund wird das Medium gewechselt. Anschließend erfolgt ein Mediumwechsel alle zwei Tage, wie in Kapitel 2.2.3. Zellkultur beschrieben.

Tag 0: Auftauen und Kultivierung
Tag 3: Scaffoldbesiedelung
Tag 5: Mediumwechsel
Tag 7: Beginn der Experimente

Tab. 2.2: Durchschnittliches Zeitschema nach dem Auftauen

## 2.2.7 Besiedelung von Scaffolds

Als Träger zur Besiedelung wird Kollagen-resorb genutzt, ein dreidimensionales Kollagengerüst. Es wird unter sterilen Kautelen in eine Zellkulturschale (100 x 20 mm) gelegt und mit einem Skalpell in Stücke der Größe 5 mm x 5 mm geteilt. Aufgetaute und anschließend kultivierte Zellen werden mit 20 ml PBS gespült und mit 4 ml Trypsin von dem Flaschengrund gelöst. Mit 5 ml Komplettmedium I wird diese Suspension in 50 ml Tubes überführt. Um etwaige verbliebene Zellen zu erfassen wird die Flasche mit weiteren 5 ml Komplettmedium I gespült und die Suspension in das Tube gegeben. Nach drei minütigem Zentrifugieren mit 900 U/min wird das Pellet mit 100 µl resuspendiert. Mit Hilfe einer Spritze und einer 27 G<sup>3/4</sup> Kanüle werden die 100 µl in ein Schwammstück unter mehrmaligen Infiltrieren so eingebracht, dass möglichst keine Flüssigkeit und damit Zellen aus dem Schwamm austreten. Das besiedelte Scaffold wird in einer kleineren Petrischale (60 x 15 mm) vorsichtig mit 7 ml Komplettmedium I überschichtet und in einem Inkubator mit 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.8 Kultivierung der besiedelten Scaffolds

Die besiedelten Scaffolds werden in einem Inkubator bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und mit Wasserdampf gesättigter Luft kultiviert. Alle zwei Tage erfolgt ein Mediumwechsel. Dazu wird das Medium aus der Petrischale abgesaugt und 7 ml Kompletmedium I zurückgegeben. Die besiedelten Scaffolds werden fünf Tage kultiviert, um den Zellen eine Adhäsion an das Kollagen-resorb zu ermöglichen. Damit soll verhindert werden, dass die Fibrochondrozyten in den ersten Bioreaktorzyklen aus dem Kollagengerüst gedrückt werden.

### 2.2.9 Kultivierung von Vergleichskulturen

Als Kontrollkultur dienen ausgesiedelte Zellen in Zellkulturflaschen, die wie in 2.2.3. Zellkultur beschrieben kultiviert werden. Dadurch kann die Proliferation und die Morphologie der Fibrochondrozyten kontrolliert und etwaige auftretende Infektionen frühzeitig erkannt werden.

## 2.3 Bioreaktor DPR50

Die Bioreaktoreinheit besteht aus dem druckpulsierenden Bioreaktor DPR50 (**d**ruck**p**ulsierender Bioreaktor bis **50** bar), einem Computer und einer Presslufteinheit bestehend aus einer Pressluftflasche und einem Druckminderer. Der eigentliche Bioreaktor besteht aus einem Korpus mit Deckel und Diffusor, einer Silikonmembran, je zwei Medium- und Druckventilen und zwei Sensoren für Druck und Temperatur.

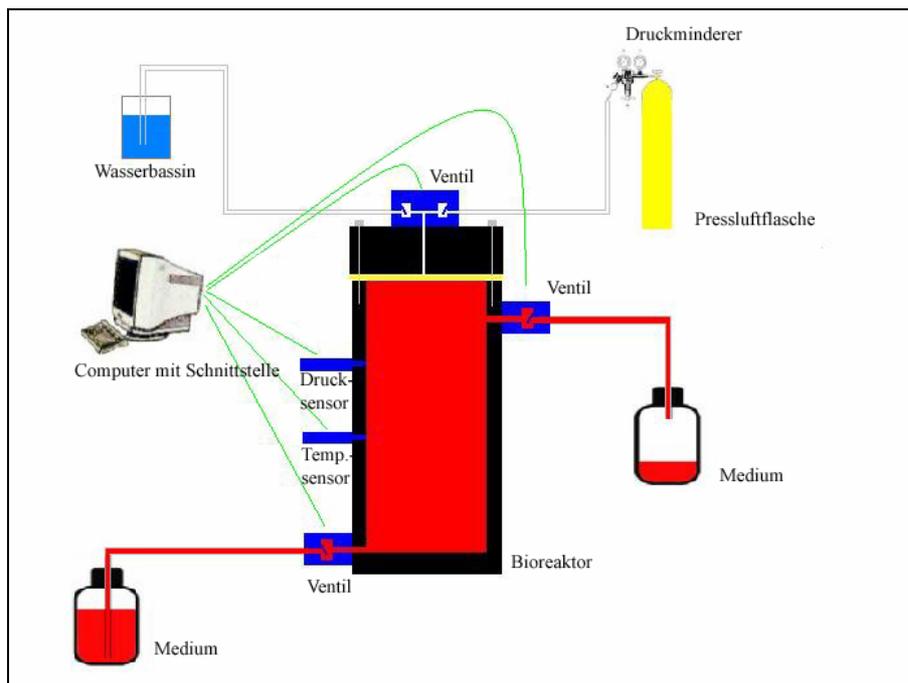


Abb. 2.1: Übersicht über eine Bioreaktoreinheit

### 2.3.1 Materialien

Es wurde bei der Materialauswahl streng darauf geachtet, dass nur solche Materialien zur Verwendung kommen, die biologisch inert sind, das heißt solche, die weder Stoffe aufnehmen noch Stoffe an ihre Umgebung abgeben.

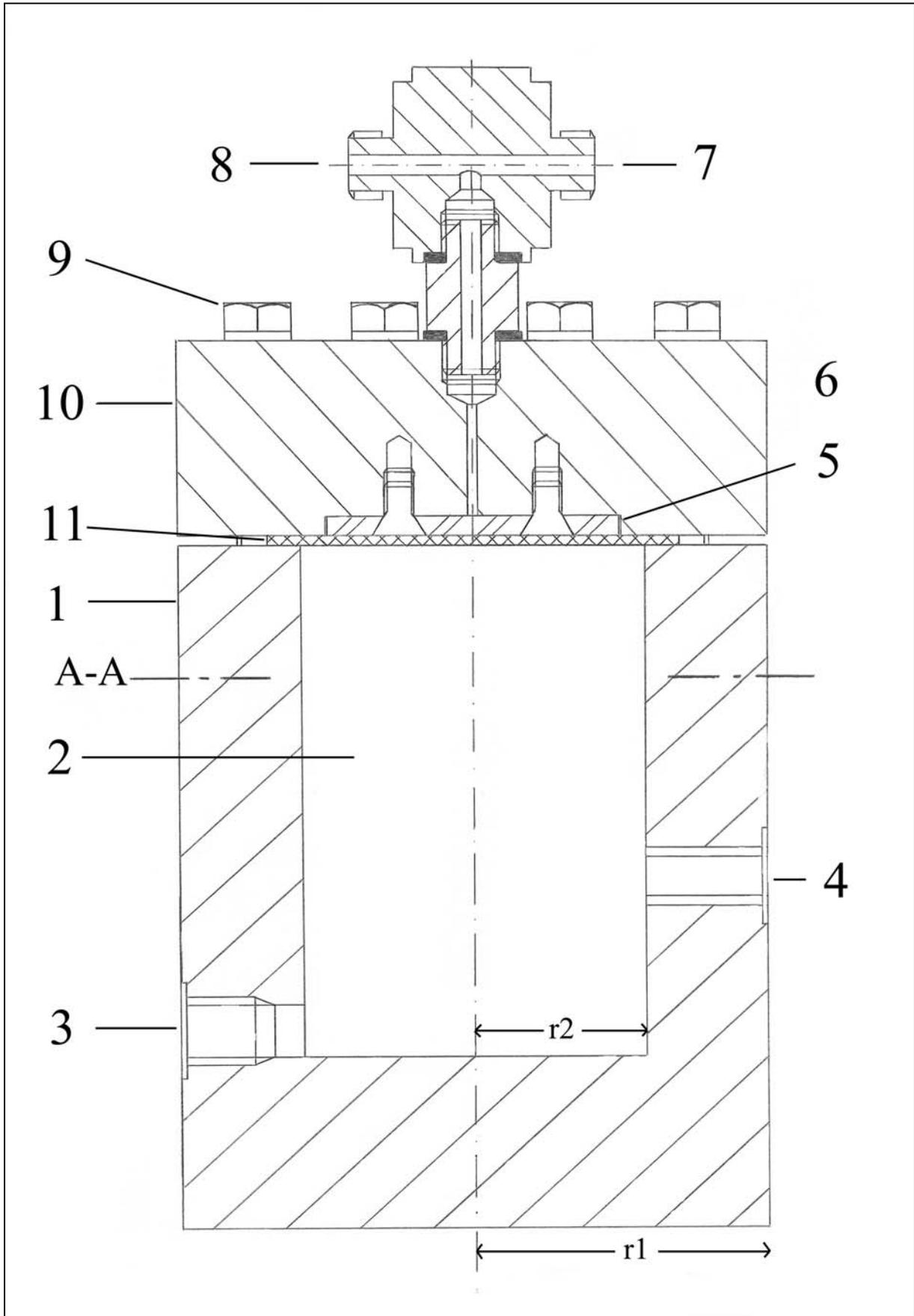
Der Korpus des Bioreaktors besteht aus einem hochwertigem Edelstahl (V2A). Gleiches gilt für die Ventile. Die Ventildichtungen bestehen ebenso wie die eingesetzte Druckmembran aus Silikon. Ebenfalls aus Silikon bestehen die Mediumschläuche und Verbindungsstücke.

### 2.3.2 Konstruktion Bioreaktor DPR50

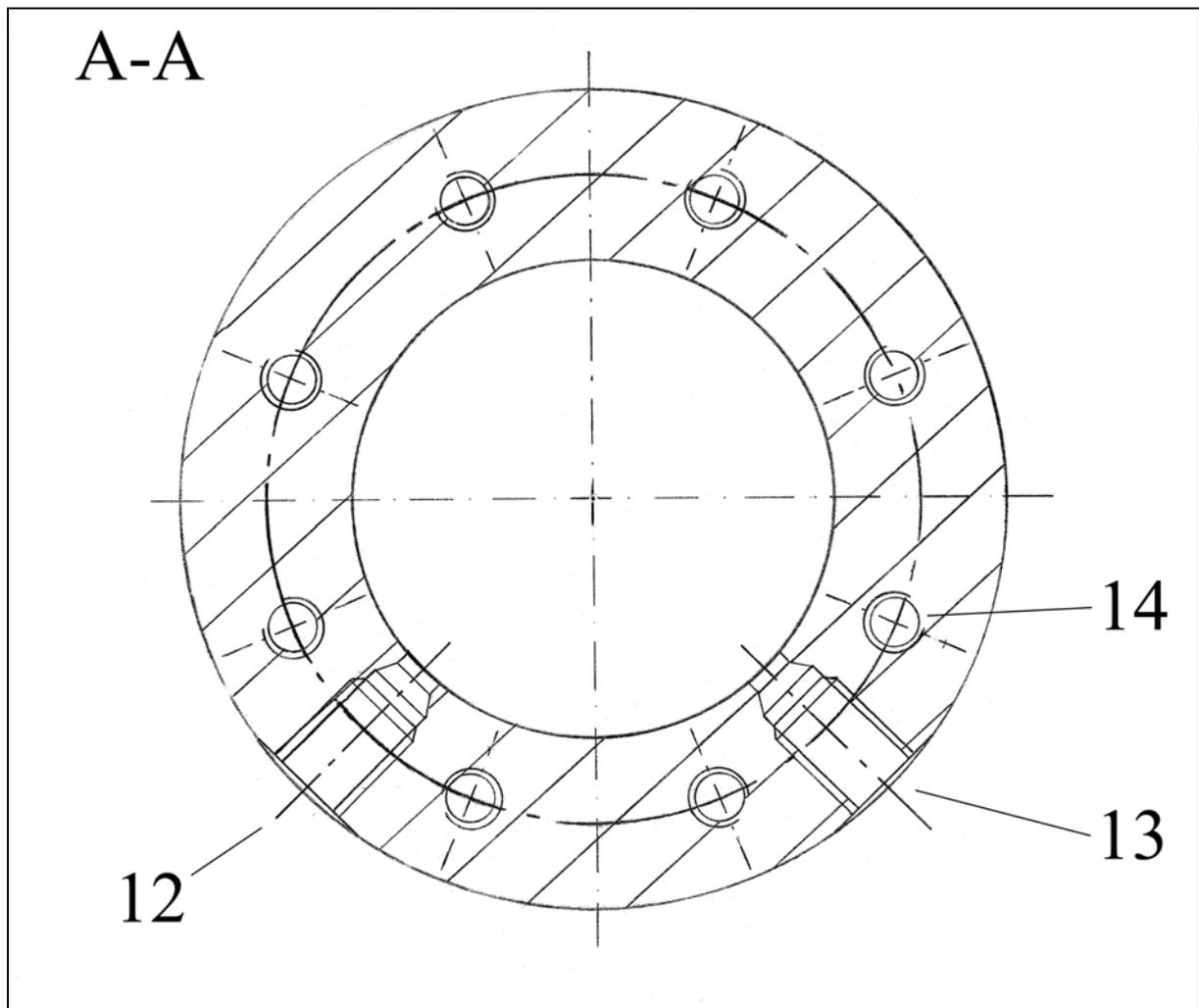
Nach den Zeichnungen 1 bis 4 wird von den Feinmechanikern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München der Bioreaktor aus einem 180 mm langen, und einem Radius von 59 mm großen Rundblock V2A Edelstahl gefertigt.

#### 2.3.2.1 Hauptkammer

Die Hauptkammer (1-2) besteht aus einem Stück V2A Edelstahl. Der Aussenradius  $r_1$  beträgt 59 mm, der Innenradius  $r_2$  35 mm. Es sind vier Bohrungen (1-3,1-4,1-12,2-13) in die Kammer angebracht. Zwei Bohrungen dienen dem Mediumtransport, die anderen beiden Bohrungen nehmen einen Druck- und Temperatursensor auf. Die Bohrungen (1-3,1-13) für den Mediumfluss befinden sich an der Unterkante des Innenzylinders und 25 mm von der Oberkante des Innenzylinders entfernt. Dadurch wird eine größtmögliche Mediaumaustauschrate erzielt. Der Temperaturfühler (1-4) befindet sich in etwa in der Mitte des Innenzylinders, um eine möglichst repräsentative mittlere Temperatur wiedergeben zu können. Durch eine 2 mm dicke Silikonmembran wird der Hauptraum (1-2) der Kammer von einem Gasraum (1-6) getrennt. In dem Hauptraum sollen Zellen kultiviert werden. In dem Gasraum kann durch ein Wechselspiel der Ventile für die Gaszu- und -abfuhr in Kombination mit einem Schluss der Mediumventile Druck auf und wieder abgebaut werden, der mittelbar über die Silikonmembran auf den Hauptraum einwirkt.



Zeichnung 2.1: Bioreaktor in Seitenansicht: Legende siehe Zeichnung 2.2

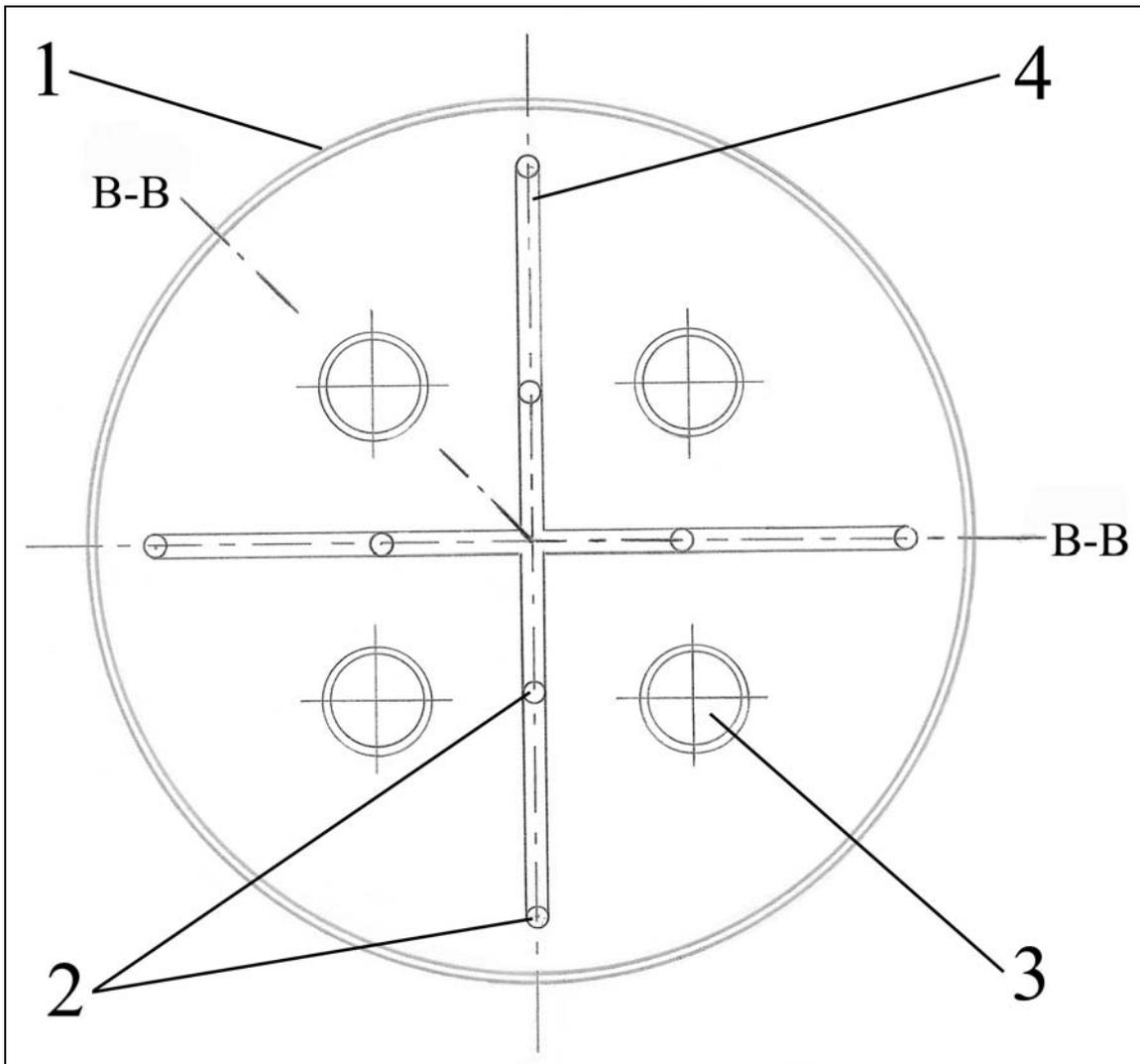


Zeichnung 2.2: Bioreaktor in Aufsicht

1. Hauptkammer 2. Hauptraum 3. Medieumeinfluß 4. Temperatursensor 5. Diffusor 6. Gasraum 7. Gasausfluß 8. Gaseinfluß 9. M8 Schrauben 10. Deckel 11. Silikonmembran 12. Drucksensor 13. Mediumausfluß 14. Gewinde für M8 Schrauben A-A. Schnittebene der Zeichnung 2.2 r11. Aussenradius r2. Innenradius

### 2.3.2.2 Diffusor

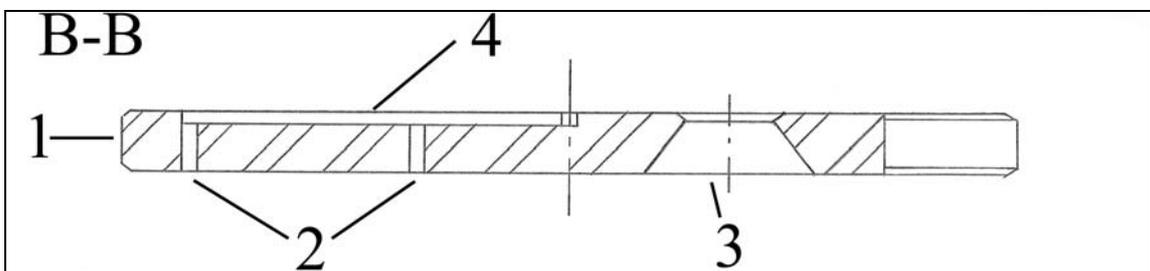
Der Diffusor verteilt die auftreffende Gasströmung auf die Silikonmembran. Durch Gasleitschienen wird die Druckluft über insgesamt acht Gasverteilungsbohrungen zu dem Gasraum geleitet, in dem der Druckauf- und -abbau erfolgt. Hierdurch entstehen keine isolierten Druckspitzen auf der Silikonmembran, sondern der Druck wird gleichmäßig auf die Gesamtfläche der Membran verteilt.



Zeichnung 2.3: Diffusor in Aufsicht

1. Diffusor 2. Bohrungen zur Gasverteilung 3. Bohrung für M6 Schraube 4. Gasleitschiene

B-B. Schnittebene der Zeichnung 4



Zeichnung 2.4: Diffusor in Seitenansicht Legende siehe Zeichnung 2.3

### 2.3.2.3 Trägergerüst

Aus einer 24-well-Zellkulturplatte wird mit einem Trennschleifer ein 100 mm mal 40 mm großes Segment ausgetrennt. Dem Segment werden an den Längsseiten je zwei Kerben eingefügt. In jedes Wellsegment wird ein 3 mm großes Loch mit einem handelsüblichen Bohrer gebohrt (s. Abb. 2.2).

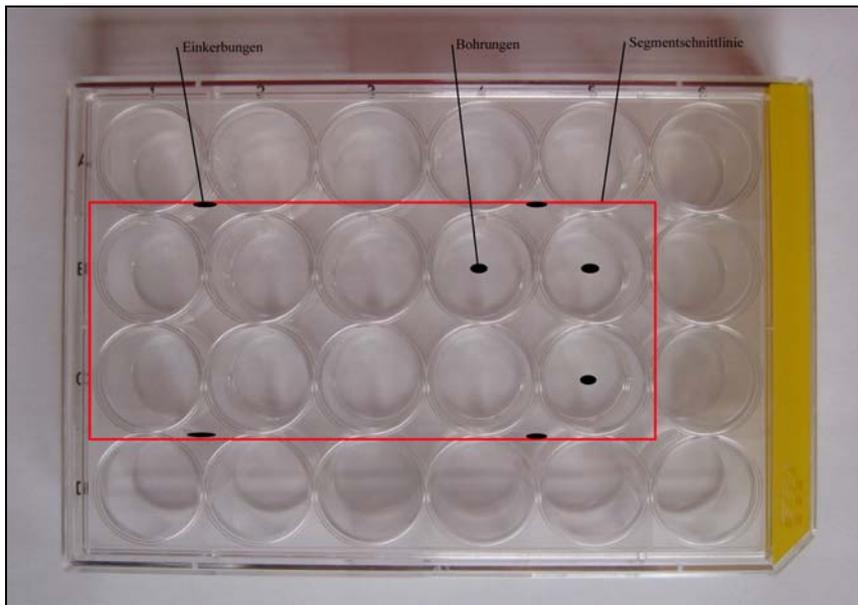


Abb. 2.2: Wellsegment

### 2.3.3 Spezifikationen

#### 2.3.3.1 Druck

Das Bioreaktorensystem ist auf einen maximalen alternierenden Betriebsdruck von 50 bar entsprechend fünf MPa ausgelegt. Der Druckverlauf wird kontinuierlich mit einer Drucksonde gemessen und über eine Schnittstelle an einen Computer geleitet. Dort erfolgt eine visuelle Darstellung mit kontinuierlicher Aufzeichnung.

#### 2.3.3.2 Frequenz

Mit der eingesetzten Steuerungssoftware lassen sich beliebige Druckszenarien verwirklichen. Zu beachten sind jedoch technische Grenzen wie die Trägheit der Ventile, Refraktärzeit der Pumpe und der maximale Druckfluss der unter anderem durch den Querschnitt der Druckleitung vorgegeben ist.

#### 2.3.3.3 Temperatur

Der Temperaturverlauf wird mittels einer in dem Bioreaktor befindlichen Temperatursonde kontinuierlich gemessen. Die Temperatur wird konstant auf 37° C gehalten. Der Bioreaktor ist mit einer speziellen Isolierhülle aus Styropor gegen Wärmeverluste geschützt. Die Wärmezufuhr erfolgt mit einer Heizplatte. Die optimale Heizplattentemperatur wird in Vorversuchen ermittelt, in denen die Temperatur der Heizplatte variiert wird und die Auswirkung auf den DPR50 aufgezeichnet wird.

#### 2.3.3.4 PH

Der pH-Wert wird mit dem Sigma Bufferall-Puffer konstant auf 7,4 gehalten. Eine Überprüfung findet mittels pH-Meter standardmäßig bei jedem Befüllen und Öffnen des Bioreaktors statt.

#### 2.3.3.5 Medium und Mediumflow

Das Medium wird in einem mehrfach isolierten Vorratsgefäß gelagert. Um Kontaminationen zu verringern wird das Vorratsvolumen minimal gehalten. Zusätzlich wird das Vorratsmedium täglich gewechselt.

Der Mediumflow kann mit Einschränkungen frei gewählt werden. Diese Einschränkung ist, dass das Medium nur in Druckpausen durch den Bioreaktor gepumpt werden kann. Außerdem ermöglicht die von uns eingesetzte Rollpumpe einen maximalen Flow von 1 ml / min. Innerhalb dieser Grenzen ist der Mediumdurchfluss variabel.

#### 2.3.4 Steuerungsprogramm

Mittels dem Steuergerät Siemens Logo! 230 RC und der Steuerungssoftware LOGO!Soft Comfort Version 3.1 können die verschiedenen Ventile zeitgesteuert geöffnet und geschlossen werden.

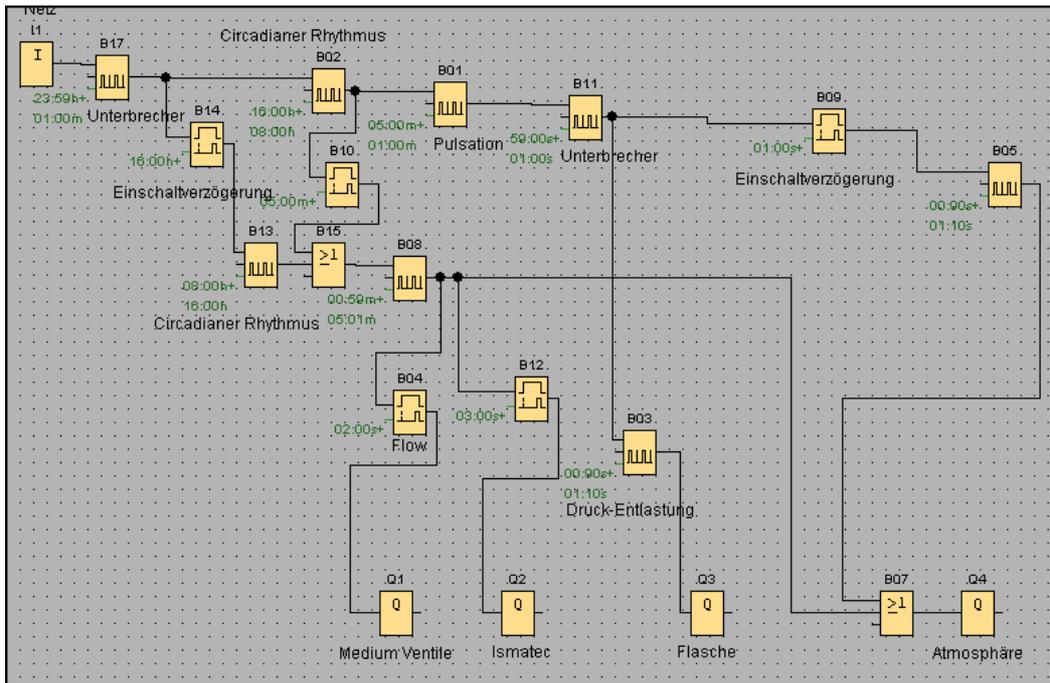


Abb. 2.3: Schaltplan herstellt mit der Software LOGO!Soft Comfort Version 3.1 von Siemens

### 2.3.5 Visualisierung der eingehenden Daten

Die von der Drucksonde und dem Temperaturmessfühler aufgenommenen Impulse werden durch digitale Multimeter VC 820 von Voltcraft und eine optische Schnittstelle an den Computer übertragen und in Datensätze umgewandelt. Mittels der Software DMM ProfiLab Version 2.0 der ABACOM-Ingeniurgesellschaft können die Daten aufgezeichnet und auf dem Computerdesktop wiedergegeben werden. So kann die gemessene Temperatur mit der aktuellen Uhrzeit und Zyklusdauer verknüpft werden und auf der Wiedergabemaske visualisiert und gespeichert werden. Auch der aufgenommene Druckimpuls wird mit der Uhrzeit und Zyklusdauer verbunden, visualisiert und gespeichert.

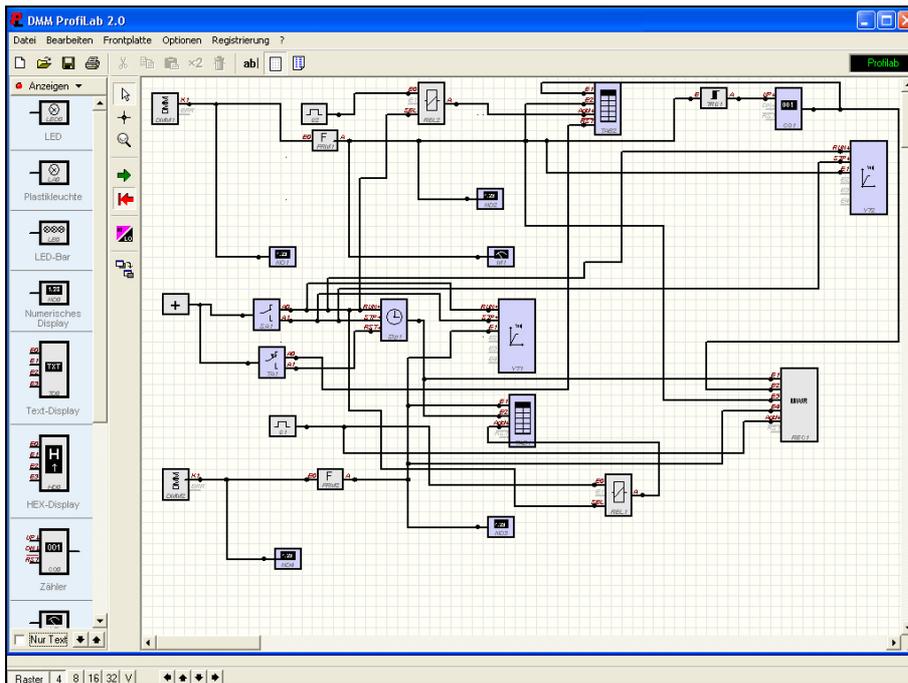


Abb. 2.4: DMM Profilab 2.0 mit Schaltplan

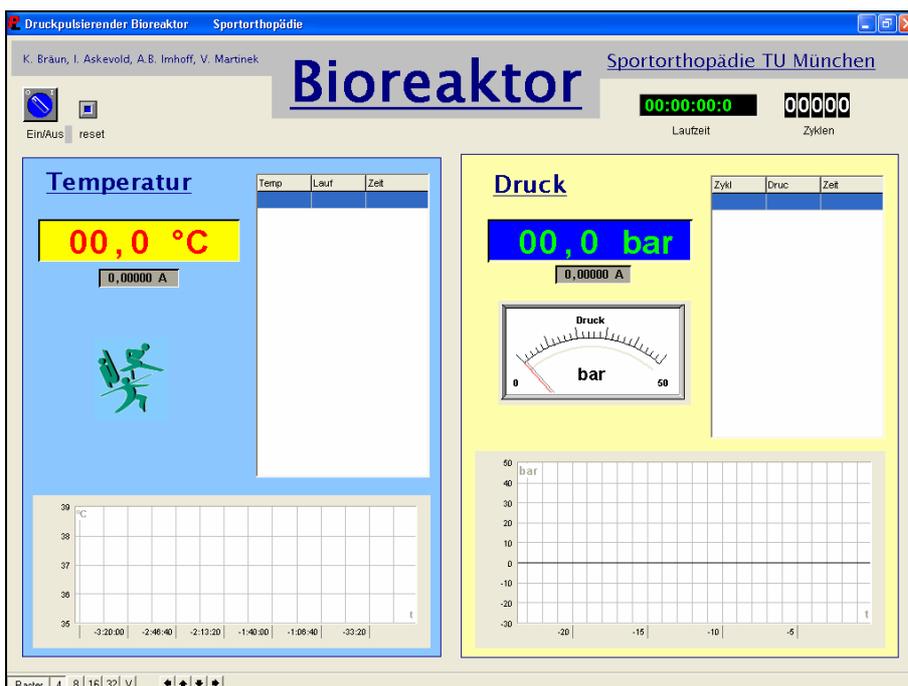


Abb. 2.5: Wiedergabemaske auf dem Computerdesktop

Die Maske stellt die Temperatur und den Druck des Bioreaktorinnenraums visuell dar. Es werden die aktuelle Temperatur und der Temperaturverlauf dargestellt. Ebenso werden der aktuell herrschende Druck und der Druckverlauf wiedergegeben. Außerdem werden die Anzahl der Zyklen und die Versuchsdauer angezeigt.

## 2.3.6 Bioreaktorkultur

### 2.3.6.1 Bioreaktorzyklen

Das zeitliche Schema für Bioreaktorenzyklen besteht aus mehreren Phasen. Phase I, die Druckphase, besteht aus einem vierminütigen Druckzyklus, bei dem mit einer Frequenz von 0,5 Hz Druck auf und abgebaut wird. Diese Phase wird jede Minute von einer einsekündigen Synchronisierungsphase unterbrochen. Anschließend folgt die Phase II, die Mediaumtauschphase. Diese Phase hat eine Dauer von einer Minute. In dieser Zeit sind die Gasventile geöffnet. Es herrscht Raumdruck. In dieser Phase wird durch die ebenfalls geöffneten Mediumventile Medium in die Kammer mit einem Flow von einem ml / min gepumpt. Phase I und Phase II alternieren über einen Zeitraum von acht Stunden. Diesem Zyklus folgt Phase III, eine vierstündige Ruhephase, in der die Gas- und Mediumventile geöffnet sind. Dadurch herrscht im Bioreaktorinnenraum atmosphärischer Druck. Auch in dieser Phase wird mit einem Flow von einem ml pro Minute alle vier Minuten für die Dauer einer Minute Medium zugeführt.

### 2.3.6.2 Vorbereitung des Bioreaktors

Vor jeder Versuchsdurchführung werden bei einem bar Überdruck und 121° C über 20 min alle Teile des Bioreaktors ebenso wie die für den Zusammenbau benötigten Werkzeuge autoklaviert. Alle Teile des Bioreaktors werden in einem Inkubator auf 40° C für 12 h vorgewärmt. Der Zusammenbau des Bioreaktors erfolgt unter sterilen Kautelen. Druck- und Temperatursensor werden mit Dichtungsringen versehen in den Korpus geschraubt. Anschließend werden die Mediumventile ebenfalls mit Dichtungsringen an dem Korpus befestigt. Der Diffusor im Deckel wird mit einem Schraubenzieher festgezogen und die Gasventile am Deckel angebracht. Der Korpus des Bioreaktors wird mit auf 37° C vorgewärmten Kompletmedium II gefüllt (s. Abb. 2.6).



Abb. 2.6: Vorbereitung des Bioreaktors

### 2.3.6.3 Bestückung des Bioreaktors

Bis zu zwanzig besiedelte Scaffolds werden aus den Kulturschalen in zwei Trägergerüste mit einer Pinzette überführt. Die Trägergerüste werden mit einer sterilen Kompresse voneinander getrennt und mit chirurgischem Nahtmaterial verbunden (s. Abb. 2.7). Das bestückte Scaffoldgerüst wird mittels Pinzette in das Komplettmedium II eingetaucht. Überfließendes Medium wird abgesaugt. Eine Silikonmembran wird blasenfrei über den Korpus gelegt (s. Abb. 2.8). Der Deckel wird mit acht Schrauben an dem Korpus befestigt. Die Schrauben werden im Uhrzeigersinn mehrmals festgezogen. Die Ventile und Sensoren werden mit einer elektronischen Steuereinheit verbunden. Das gaszuleitende Ventil wird mit einer Druckluftflasche, 200 l Volumen und 60 bar Druck, verbunden. Abgeleitete Druckluft wird mit einem Schlauch in ein Wasserbassin geleitet. Der Bioreaktor wird auf einer 38 bis 39° C warmen Heizplatte justiert (s. Abb. 2.9) und mit einer Styroporhülle isoliert.

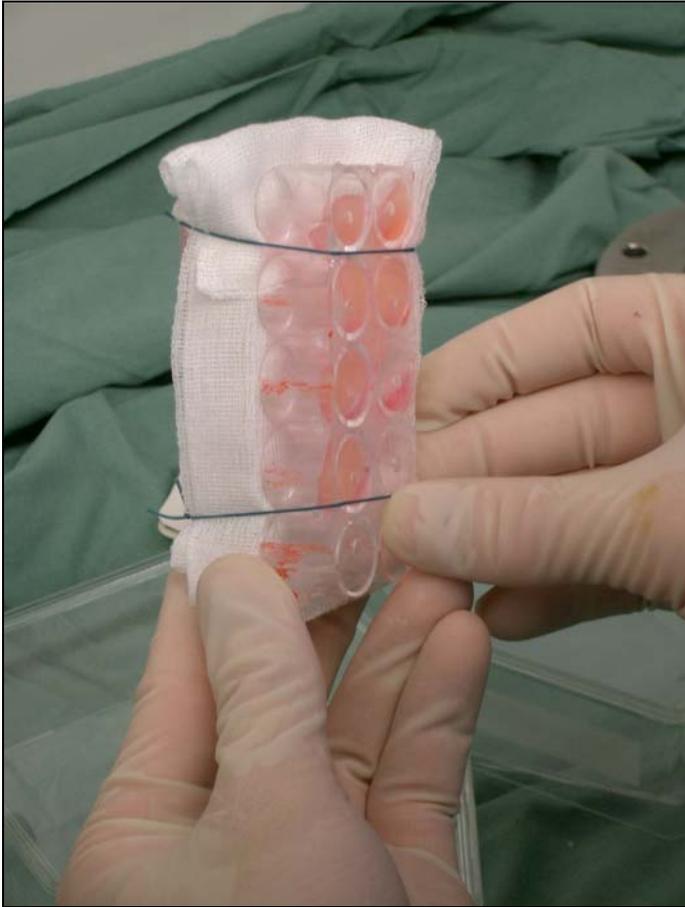


Abb. 2.7: Bestücktes Trägergerüst



Abb. 2.8: Bestückter Bioreaktor vor dem Verschluss



Abb. 2.9: Betriebsfertiger Bioreaktor ohne Isolierung

## 2.4 Experimente

### 2.4.1 Vorversuche

#### 2.4.1.1 Nachweis der Inertheit - Mediumkontrolle

Um die Inertheit des DPR50 zu untersuchen, werden mit Medium, das nach zweitägiger Bioreaktorlaufzeit als Überstand entsteht, Zellkulturen, die nach 2.2.5 und 2.2.6 aufgetaut und kultiviert werden, angelegt. Hierbei werden jeweils 2 Millionen Zellen eingesetzt. Insgesamt erfolgte die Kultivierung von 20 Proben.

Als Vergleichsmedium dient Medium, das bei regulärer Zellkultur und entsprechendem zweitägigem Mediumwechsel nach 2.2.3 anfällt. Auch hiermit werden insgesamt 20 Kulturen mit je 2 Millionen Zellen angelegt, die nach 2.2.5 und 2.2.6 behandelt werden.

#### 2.4.1.2 PH-Messung

Der Bioreaktor wird nach 2.3.6 vorbereitet und in Betrieb genommen. Für eine exakte pH-Wertmessung wird die Kammer tagsüber alle 4 Stunden (8, 12, 16, und 20 Uhr) und während der Nacht (2 Uhr) einmal geöffnet und der pH-Wert im Medium mittels pH-Meter gemessen. Dies erfolgt über einen Zeitraum von fünf Tagen. Dieser Vorversuch wird fünfmal durchgeführt.

#### 2.4.1.3 Temperaturkontrolle

Durch Vorversuche, die nach 2.3.6 ohne besiedelte Scaffolds durchgeführt werden, wird die Temperaturkonstanz überprüft. Diese Vorversuche mussten wegen später beschriebenen baulich-funktionellen Besonderheiten des Reaktors mehrmals mit modifizierten Isolierungen und veränderten Temperaturen der Wärmeplatte wiederholt werden.

### 2.4.2 Experimente bei 2, 5 und 10 bar alternierendem Druck

Es werden Experimente mit 2, 5 und 10 bar alternierendem Druck bei einer Frequenz von 0,5 Hz und nach 2.3.6 Bioreaktorzyklen durchgeführt. Es werden an den ersten Tagen eines fünftägigen Kulturzyklus 18000 bzw. 28000 Zyklen durchgeführt. In den folgenden Tagen erfolgt keine weitere Druckpulsation. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Kulturen zu

gewährleisten werden alle Kulturen über fünf Tage in dem Bioreaktor kultiviert auch wenn an den letzten Tagen keine Pulsationen mehr durchgeführt werden. Während der Experimente erfolgt die kontinuierliche Aufzeichnung des Druckes und der Temperatur. Ebenfalls bestimmt wird der pH-Wert zu Beginn und Ende des Experimentes.

Die Experimente bei zwei und fünf bar Druck werden 8 Mal durchgeführt, bei zehn bar Druck 4 Mal.

Der Bioreaktor DPR50 wird für jedes Experiment mit 20 Fibrochondrozyten-besiedelten Scaffolds bestückt. Zur Besiedelung werden Zellreihen von unterschiedlichen Tieren verwendet. Jeweils fünf Matrices werden mit der gleichen Zellreihe besiedelt. Ein Scaffold wird hierbei mit 20 Millionen Zellen besiedelt. Insgesamt werden vier unterschiedliche Ausgangszellreihen pro Versuchsanordnung eingesetzt, die jeweils fünf gleiche Matrices ergeben.

Die fünf Matrices einer Zellreihe werden wie folgt zur weiteren Analyse verwendet: zwei Scaffolds zur Rekultivierung nach 2.5.3, ein Scaffold zur Vitalitätsprobe nach 2.5.4, ein Scaffold für die Histologie nach 2.5.1 und ein Scaffold zu Glykosaminoglykananalyse nach 2.5.2.

## 2.5 Analytik

### 2.5.1 Histologie

Zur histologischen Untersuchung kommen besiedelte Scaffolds die im Rahmen der Experimente entstehen. Es werden Scaffolds vor und nach Druckpulsationen verwendet. Es erfolgt eine Einbettung in Paraffin. Diese Paraffinblöcke werden in Schichten zu 5 µm Dicke geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Die Schnitte werden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Es wird im Besonderen auf die Anzahl und Verteilung der Zellen, deren Zellmorphologie und umgebende Zellmatrix sowie die Adhäsion an die Kollagenmatrix geachtet.

### 2.5.2 Glykosaminoglykan-Analyse

Die Analyse des Glykosaminoglykangehalts erfolgt mit dem Blyscan Sulfated Glycosaminoglykan Assay der Firma biocolor, Irland. Der Assay stellt eine quantitative Farbstoff-Bindungsmethode zur Bestimmung sulphatierter Glykosaminoglykane dar und dient als quantitativer Marker für die Produktion extrazellulärer Matrix.

#### 2.5.2.1 Blyscan Sulfated Glykosaminoglykan Assay

5-10 mg der zu untersuchenden Scaffolds werden gewogen und in ein Tube bekannter Masse gegeben. Diese Probe in H<sub>2</sub>O schockgefroren und dann für 24 h in einen Lyphilisator gestellt. Das Gewicht wird bestimmt und die Probe mechanisch in feine Stücke zerkleinert. Diese Stücke werden in 10 ml destilliertem H<sub>2</sub>O für fünf Minuten rehydriert und mittels Mixer homogenisiert. Bei 900 U/min und 37° C wird für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand auf einen ml reduziert und anschließend ein zweites Mal für 24 h lyophilisiert. Das Probengefäß wird gewogen und durch die bekannte Masse des Tubes kann die Probenmasse bestimmt werden. Die Extraktion der Glykosaminoglykane erfolgt mit der Salzextraktionslösung nach Farndale, bestehend aus 4 M Guanidin-HCl, 0,1 M 6-Aminohexanonic Acid, 0,01 M Na<sub>2</sub>EDTA und 0,05 M Natriumessig. Die Probe wird in 5 ml Extraktionslösung überführt und 12 h im Wärmeschrank mit Shaker bei 37° C inkubiert.

100 µl des Überstandes wurden zur Ermittlung des Glykosaminoglykangehaltes eingesetzt. Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, die in Anhang 6.1 angegeben sind.

### 2.5.3 Rekultivierung

Um die Vitalität, das Wachstumsverhalten und die Differenzierung der Zellen in einem besiedelten Scaffold untersuchen zu können, werden die Fibrochondrozyten aus dem Kollagen-resorba-Schwamm gelöst und angezchtet. Hierzu werden die besiedelten Träger in ein Tube gegeben und mit 10 mg Collagenase A in 10 ml Komplettmedium überschichtet. Nach zwei Stunden wird diese Suspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml Komplettmedium wieder in Suspension gebracht. Die Suspension wird in Zellkulturflaschen überführt und mit 10 ml Komplettmedium aufgefüllt. Des Weiteren werden sie, analog zu 2.2.6 Kultur nach Auftauen, kultiviert.

### 2.5.4 Vitalitätsprobe

Aus besiedelten Kollagen-resorba-Schwämmen werden, analog zu 2.5.3 Rekultivierung, Fibrochondrozyten gelöst. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und dann jedoch mit einem Gemisch aus Tryptan blue solution und Komplettmedium im Verhältnis 1:1 überschichtet und resuspendiert. Mittels einer Neubauerzählkammer können die angefärbten von den nicht angefärbten (vitalen) Zellen unterschieden und gezählt werden. Damit kann der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt werden.

Als Kontrolle dienen Zellkulturen (n=10) die nicht in ein Scaffold implantiert werden, sondern nach 2.2.6 Kultur nach Auftauen behandelt werden.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Zellkultur**

Fibrochondrozyten können aus operativ gewonnen Schafsmenisci isoliert werden. Aus einem entnommen Meniskus werden im ersten Schritt ca. 15 Millionen Zellen isoliert. Durch weitere Kultivierung (vgl. Tab. 2.1) und zweimaliges Splitten können die Fibrochondrozyten auf eine Population von bis zu 90 Millionen Zellen vermehrt werden. Insgesamt wurden neun Schafsmenisci operativ gewonnen. Bei der weiteren Aufarbeitung mussten zwei Menisci verworfen werden, sieben durchlaufen den kompletten Kultivierungszyklus. Es werden durchschnittlich 70 Millionen Zellen bis zur Kryokonservierung kultiviert. Diese werden in Zellportionen von zwei Millionen Zellen kryokonserviert.

In einer dreidimensionalen Kultur, wie der eingesetzten Kollagenmatrix, können Fibrochondrozyten ebenso wie in einer zweidimensionalen Kultur ohne wesentliche Änderung der Proliferationsrate und der fibrochondrozytischen Morphologie über einen Zeitraum von bis zu 12 Tagen kultiviert werden. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und Zugabe einer Solution aus 50 % FCS, 30 % DMEM und 20 % DMSO überstehen Fibrochondrozyten auch eine Kryokonservierung ohne Änderung der Proliferationsrate und Morphologie. Nach dem Auftauen der Fibrochondrozyten bis zu vier Monaten nach der Kryokonservierung werden die Zellen nach zweitägiger Kultivierung in das Kollagen-resorb-scaffold eingebracht. Nach weiteren vier Tagen sind die Zellen soweit in das Scaffold integriert, dass sie für weitere Experimente in dem Bioreaktor zur Verfügung stehen.

## 3.2 Bioreaktor DPR50

Ein Bioreaktor muss hohen Ansprüchen an Funktionalität, Haltbarkeit und Kosteneffizienz genügen. An diesen Ansprüchen muss sich der neu entwickelte DPR50 messen lassen.

### 3.2.1 Kosten

Die Aufwendungen für den DPR50 setzen sich aus Materialkosten, wie der Kammer, Ventilen, Soft- und Hardware, Kosten für die Fertigung der Kammer und Kosten der Zellkulturverbrauchsmaterialien zusammen.

Die Materialkosten betragen weniger als 700 Euro.

Zur feinmechanischen Fertigung des Reaktors wurden 15 Arbeitsstunden veranschlagt.

### 3.2.2 Technische Daten

Mit dem entwickelten Bioreaktor DPR50 ist es möglich, den Temperatur- und Druckverlauf kontinuierlich zu messen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit diese Daten an eine Recheneinheit in Echtzeit zu exportieren und dort zu visualisieren und aufzuzeichnen.

#### 3.2.2.1 Druckverlauf

Der Druckverlauf einer Pulsation ist exemplarisch für fünf bar alternierendem Druck in Abb. 3.1 dargestellt. Der Druckaufbau erfolgt innerhalb von 0,3 Sekunden. Ein Druck von fünf bar wird 0,7 Sekunden konstant gehalten. Diesem Druckplateau folgt der Druckabbau innerhalb von 0,1 Sekunde. Nach weiteren 0,3 Sekunden ist ein vollständiger Druckausgleich mit der Umgebung erreicht. Somit ist der Kammerdruck gleich dem aktuellen atmosphärischen Druck. Nach 0,6 Sekunden beginnt der nächste Zyklus mit einer erneuten Druckaufbauphase.

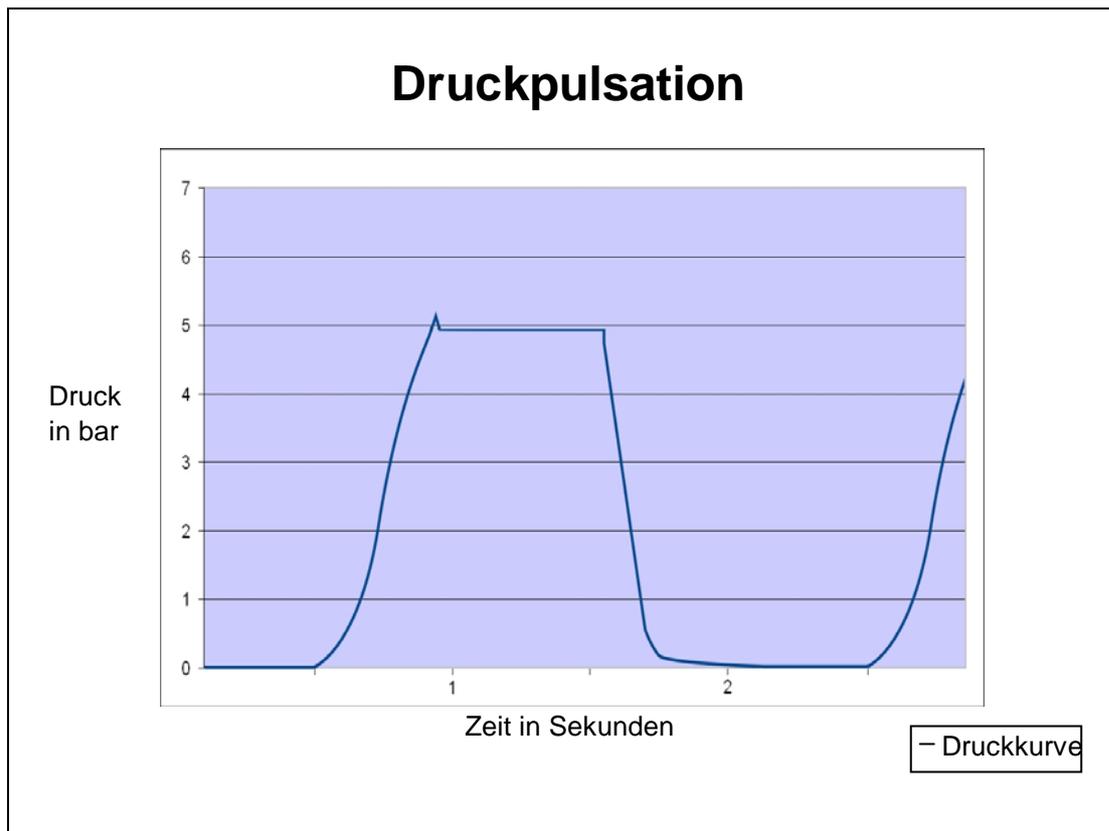


Abb. 3.1: Druckverlauf während einer Pulsation

#### 3.2.2.2 Mediaumtauschrate

Der Bioreaktor hat ein Mediumfassungsvolumen von maximal 405 ml Flüssigkeit. Durch Einsatz des bestückten Trägergerüsts reduziert sich das Volumen auf 335 ml. Bei einem eingestellten Mediumflow von einem ml / min alle fünf Minuten ergibt sich ein kompletter Mediaumtausch nach insgesamt 28 Stunden oder entsprechend werden 86 % des Mediums in 24 Stunden ausgetauscht.

#### 3.2.2.3 Pressluftverbrauch

Bei einem durchschnittlichem Gasverbrauch von 7,5 l / min bei 5 bar Druck und 0,5 Hz müssen die eingesetzten Pressluftflaschen (200 bar, 60 l) etwa alle 48 h gewechselt werden, um einen ausreichenden Druck mit einer gewissen Sicherheitsreserve aufbauen zu können. Pro Minute werden 30 Zyklen durchgeführt. Pro Stunde werden während 48 Minuten Zyklen ausgeführt, also  $30 \times 48 = 1440$  Zyklen. In 24 Stunden werden während 16 Stunden Druck ausgeübt, also finden  $1440 \times 16 = 23040$  Zyklen statt. Bei einem durchschnittlichen Verbrauch von 2,5 l für 10 Zyklen, werden 5760 Liter pro Tag benötigt.

Der Inhalt einer Pressluftflasche ergibt 12000 Liter. Berücksichtigt man den Mindestdruck von 5 bar und eine Sicherheitsreserve beträgt das nutzbare Volumen maximal 11000 Liter. Jede Pressluftflasche reicht somit ca. 2 Tage. Sie sollten daher zur Wahrung einer ausreichenden Sicherheitsreserve vor Ablauf von 48 h gewechselt werden.

#### 3.2.2.4 Nachweis der Inertheit - Mediumkontrolle

Mit Vorversuchen nach 2.4.1.1 wird die Inertheit des Bioreaktors untersucht, das heißt ob die eingesetzten Materialien zelltoxische Stoffe in das Kulturmedium abgeben. Nach dreitägiger Kultivierung mit „recycltem“ und regulärem Bioreaktormedium werden die Proben (n=20) makroskopisch und mikroskopisch beurteilt und mit der Kontrollgruppe (n=20) verglichen. Makroskopisch sind keine bakteriellen oder mykotischen Verunreinigungen zu erkennen. Auch mikroskopisch sind keine Bakterienkolonien oder Myzelen zu sehen. Des Weiteren sind Zellform und Größe der zu vergleichenden Kulturen nicht zu unterscheiden und entsprechen der Fibrochondrozytenmorphologie. Auch die Zelladhäsion an das Kulturgefäß und die Zelldichte ist in beiden Kulturreihen identisch.

#### 3.2.3 PH-Wert

##### 3.2.3.1 Vorversuche

Durch Vorversuche (n=5) nach 2.4.1.2 wird der pH-Verlauf während eines Tages ermittelt. Der pH-Wert des Bioreaktormediums beträgt  $7,4 \pm 0,1$ . Bei fünf Vorversuchen mit je fünf Messzeitpunkten betrug der Mittelwert 7,400 bei einer Standardabweichung von 0,039 (Abb. 3.2).

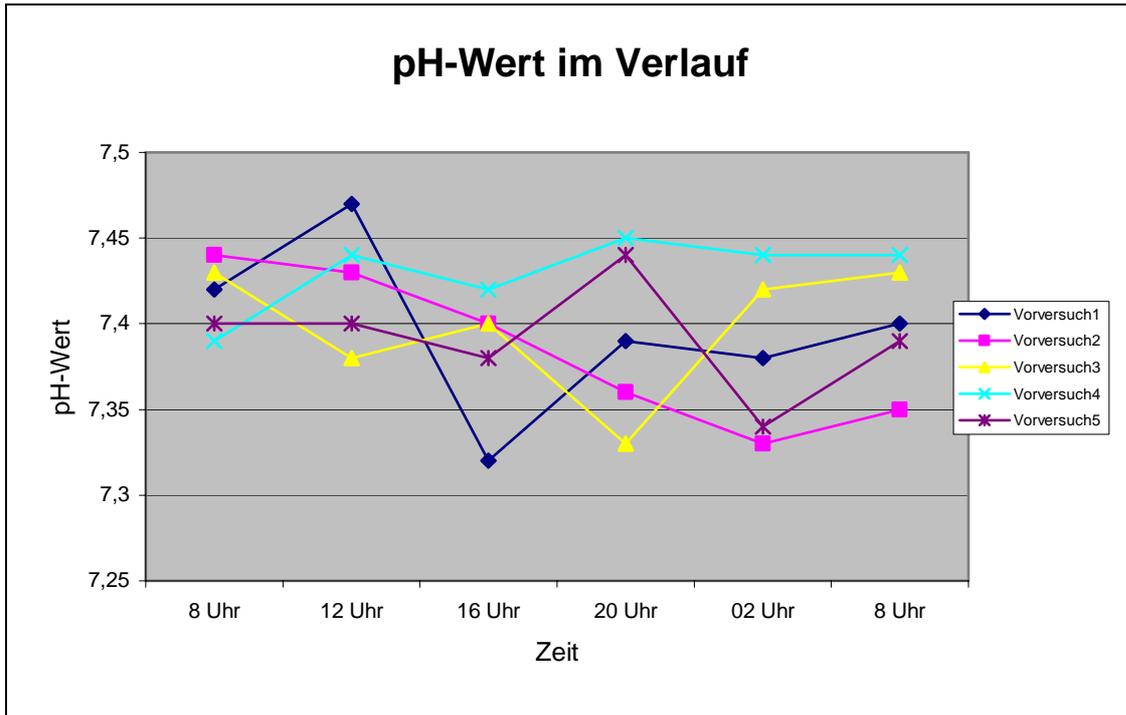


Abb. 3.2: PH-Wertverlauf innerhalb eines Tages

### 3.2.3.2 PH-Wert im Verlauf der Experimente

Der gemittelte pH-Wert zu Beginn von zehn repräsentativen Versuchszyklen beträgt 7,425,  $SD=0,034$ . Bei Abschluss der Experimente beträgt der mittlere pH-Wert 7,361, die Standardabweichung 0,028 (Abb. 3.3).

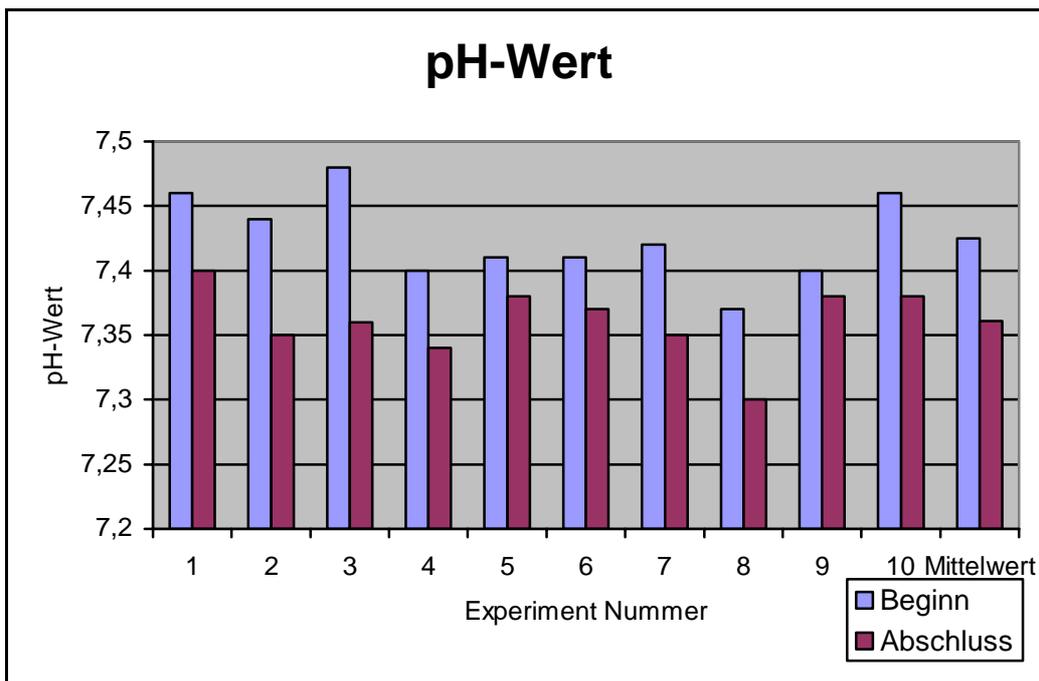


Abb. 3.3: PH-Wert im Verlauf

### 3.2.4 Temperatur

#### 3.2.4.1 Heizplattenabhängigkeit der Bioreaktorkerntemperatur

Durch eine Vorversuchsreihe nach 2.4.1.3 wird die optimale Temperatur der Heizplatte ermittelt, die eine Temperaturkonstanz bei 37 °C in der Mediumflüssigkeit des Bioreaktors DPR50 ermöglicht. Die Temperatur der Heizplatte wird variiert bis konstant 37 °C im Inneren des DPR50 herrschen. Dies ist bei einer Temperatur von 38 °C der Heizplatte der Fall (vgl. Abb. 3.4).

Über einen Zeitraum von 900 Minuten (15 Stunden) kann mit der Heizplattentemperatur von 38 °C die Kerntemperatur auf konstant 37 °C gehalten werden (MW=36,94 °C, SD=0,106) (vgl. Abb. 3.5).

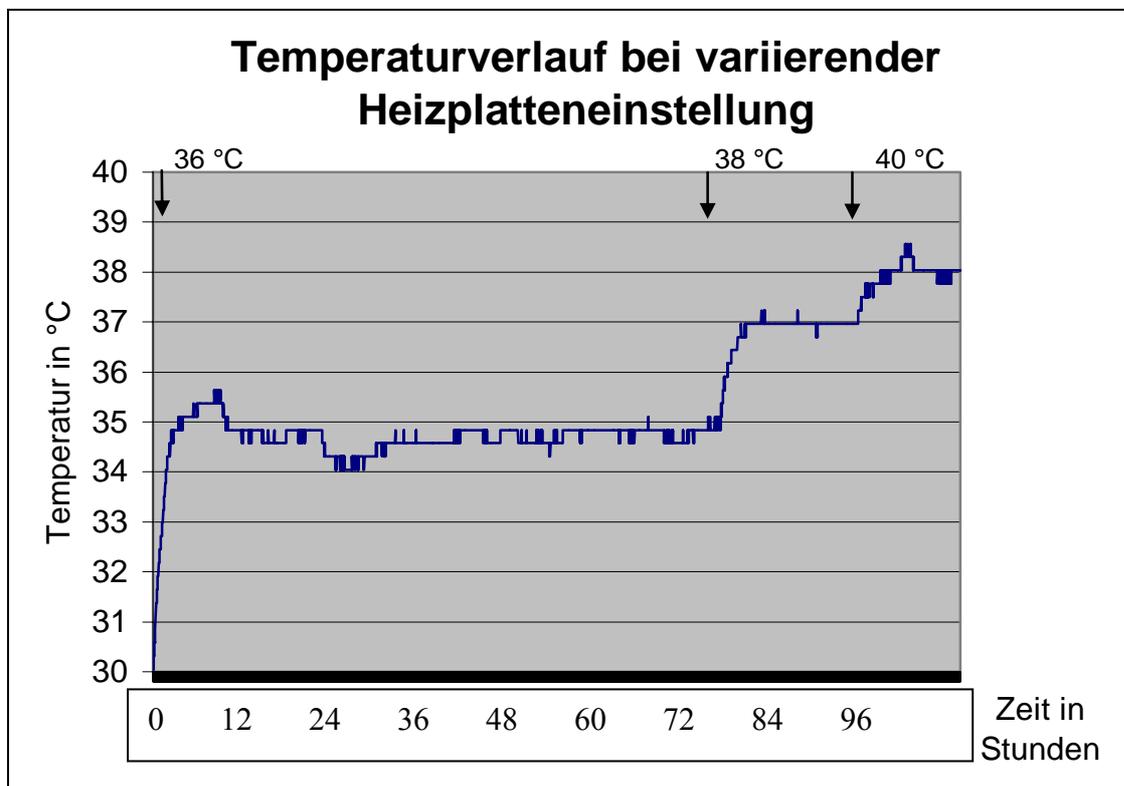


Abb. 3.4: Das Diagramm zeigt den Temperaturverlauf bei verschiedenen Heizplatteneinstellungen. Die Pfeile markieren die jeweilige Temperatur der Heizplatte

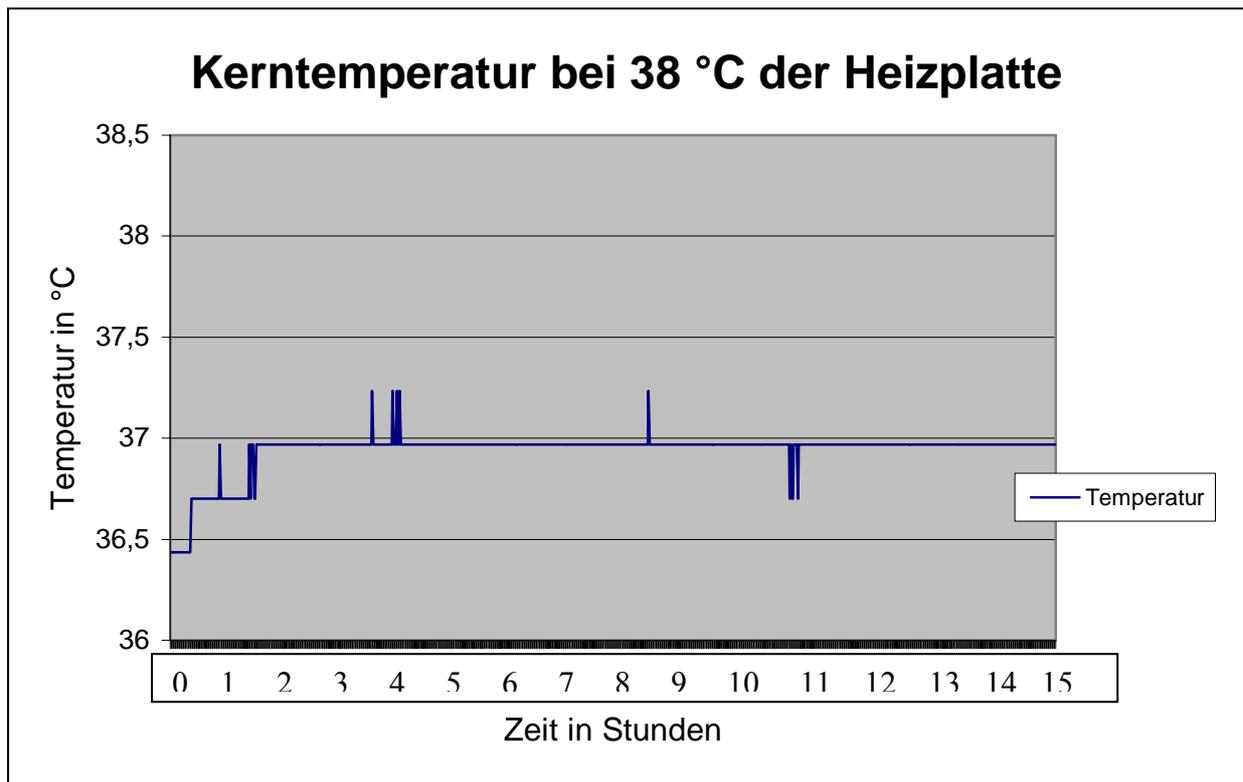


Abb. 3.5: Das Diagramm zeigt die Temperaturkurve über 900 min bei einer Heizplattentemperatur von 38 °C

### 3.2.4.2 Temperatur im Verlauf der Experimente

Die Temperatur innerhalb des Bioreaktors im Verlauf eines Tages (1440 Minuten) ist in Abb. 3.6) dargestellt.

Der Bioreaktor hat zu Beginn der Versuche eine Temperatur von gemittelt 39,5 °C. Nach Bestückung des Bioreaktors mit Scaffolds beträgt die Temperatur 38 °C. Während der Nacht sinkt die Temperatur auf minimal 35,9 °C und steigt im Verlauf des Tages auf 37,5 °C.

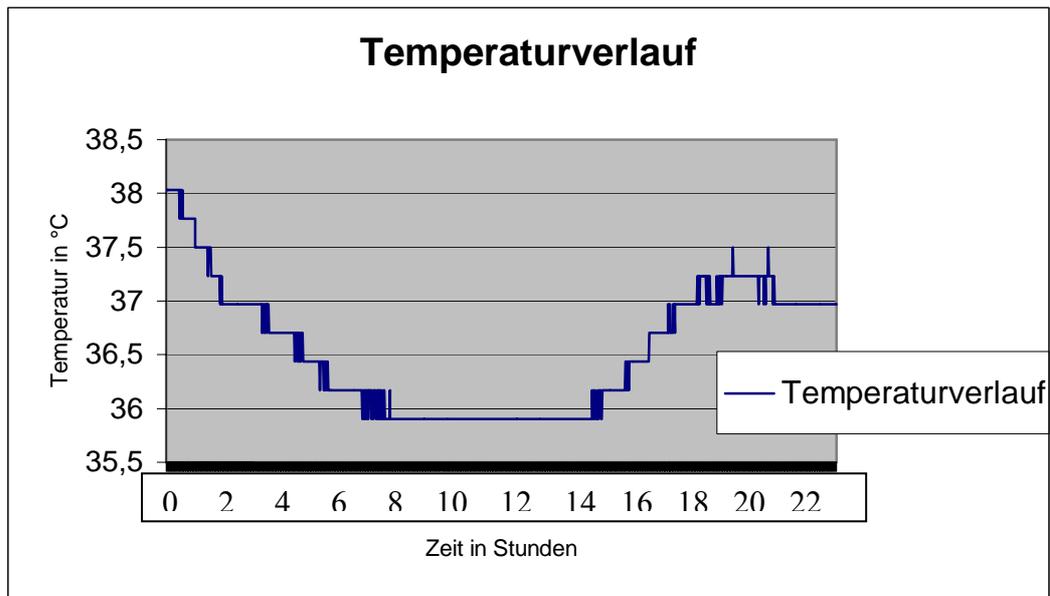


Abb. 3.6: Temperaturverlauf während einer Pulsationsphase und zweier Ruhephasen

### 3.2.5 Zusammenfassung der Leistungsdaten des Bioreaktors DPR50

Druck Frequenz	Maximal 2 Hz
Druck Kraft	Maximal 50 bar
Temperatur	Heizplatten kontrolliert (auf 37°C ± 0,5) Während der Experimente: 36 - 37,5° C
pH	Bufferall kontrolliert (auf 7,4 ± 0,1)
Mediumflow	Semikontinuierlich
Mediumflow in ml	1 ml / min
Mediumfassungsvolumen in ml	Insgesamt 405 ml 335 ml bei eingesetztem Trägergerüst
Kompletter Mediumaustausch	1 / 28 h = 86 % / 24h
Gasverbrauch	Bei 5 bar: 7,5 l / min

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Spezifikationen des Bioreaktors

### 3.3 Experimente

Der Bioreaktor DPR50 wird für jedes Experiment mit 20 Fibrochondrozyten-besiedelten Scaffolds bestückt. Hierbei werden jeweils vier unterschiedliche Zellreihen eingesetzt, entsprechend stehen fünf identische Zellscaffolds zur weiteren Analytik zur Verfügung. Zur Auswertung kommen nur Experimente, die störungsfrei durchgeführt werden können. Bei Komplikationen, wie Membran- oder Schlauchbruch, sichtbaren Kontaminationen oder technischen Problemen, werden die gewonnenen Scaffolds verworfen.

Von den fünf identischen Scaffolds werden zwei Scaffolds zur Rekultivierung nach 2.5.3, ein Scaffold zur Vitalitätsprobe nach 2.5.4, ein Scaffold für die Histologie nach 2.5.1 und ein Scaffold zu Glykosaminoglykananalyse nach 2.5.2 verwendet. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### 3.3.1 Rekultivierung

Die Zellzahlbestimmung nach der Rekultivierungsmethode spiegelt das Verhältnis von eingesetzten Zellen und den isolierbaren und rekultivierbaren Zellen wieder.

Bei allen Experimenten werden Scaffolds verwendet, die mit zwei Millionen Zellen inkubiert wurden. Bei Experimenten mit zwei bar alternierendem Druck können 86 % (n=16, MW=85,69 %, SD=7,078) bei 18000 Zyklen bzw. 83 % (n=16, MW=82,63 %, SD=4,95) bei 28000 Zyklen der eingesetzten Zellen rekultiviert werden. Dies entspricht einer Zellpopulation von 1.720.000 bzw. 1.660.000 Zellen. Bei diesen Populationen ist zu beachten, dass bei der Rekultivierung das Zellwachstum auch mit einer Zellvermehrung einhergeht. Bei fünf bar alternierendem Druck ergibt sich ein Rekultivierungsanteil von 45 % (n=16, MW=44,63 %, SD=7,80) bzw. 18 % (n=16, MW=18,19 %, SD=10,46) entsprechend 900.000 bzw. 360.000 Zellen. Bei zehn bar nimmt der Anteil an rekultivierbaren Fibrochondrozyten auf 4 % (n=8, MW=3,75 %, SD=3,11) (80.000 Zellen) bzw. 1 % (n=8, MW=0,88 %, SD=1,36) (20.000 Zellen) ab (s. Abb. 3.7).

Als Kontrollgruppe werden Experimente mit Kultur in dem Bioreaktor ohne Druckzyklen und Kulturen in regulärer Zellkultur durchgeführt. Hierbei zeigt sich ein Rekultivierungsanteil von 88 % (n=16, MW=87,94 %, SD=5,56) für die Bioreaktorkultur beziehungsweise von 87 % (n=16, MW=86,69 %, SD=4,19) für die reguläre Zellkultur.

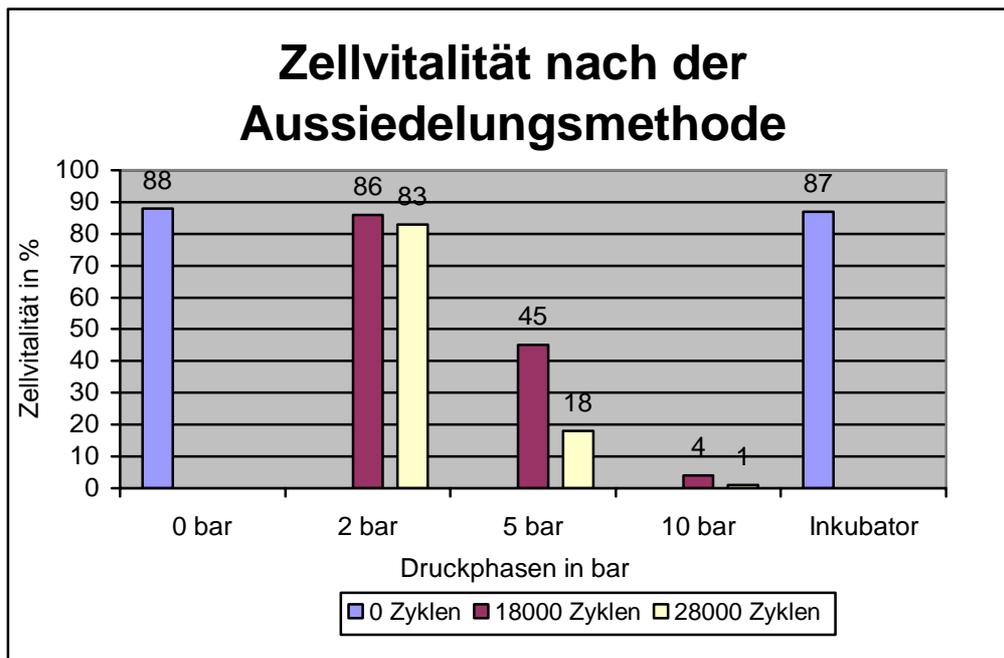


Abb. 3.7: Zellvitalität bei fünftägiger Inkubation bei 0, 2, 5 und 10 bar und 18000 bzw. 28000 Zyklen gemessen nach der Aussiedelungsmethode, als Kontrollgruppe eine reguläre Zellkultur

### 3.3.2 Vitalitätsprobe nach dem Tryptan blue Test

Der Tryptan blue Test ermittelt den Anteil vitaler Zellen an der Gesamtheit der isolierten Zellen. Bei zwei bar alternierendem Druck können gemittelt 37 % (n=16, MW=36,5 %, SD=3,65) bei 18000 Zyklen bzw. 35 % (n=16, MW=34,56 %, SD=2,9) bei 28000 Zyklen vitale Zellen isoliert werden. Dies nimmt bei fünf bar auf 23 % (n=16, MW=22,94 %, SD=6,57) bzw. 15 % (n=16, MW=14,75 %, SD=3,64) ab. Bei zehn bar alternierendem Druck können 5 % (n=8, MW=4,88 %, SD=2,47) bzw. 3 % (n=8, MW=2,88 %, SD=1,36) vitale Zellen isoliert werden (s. Abb. 3.8).

Als Kontrolle dienen auch hier Scaffolds, die ohne Druckpulsation in dem Bioreaktor DPR 50 kultiviert werden und Scaffolds in regulärer Zellkultur. Es zeigt sich eine Zellvitalität von 89 % (n=16, MW=89,31 %, SD=2,77) für die Bioreaktorkultur beziehungsweise von 92 % (n=16, MW=91,5 %, SD=3,33) für die reguläre Zellkultur.

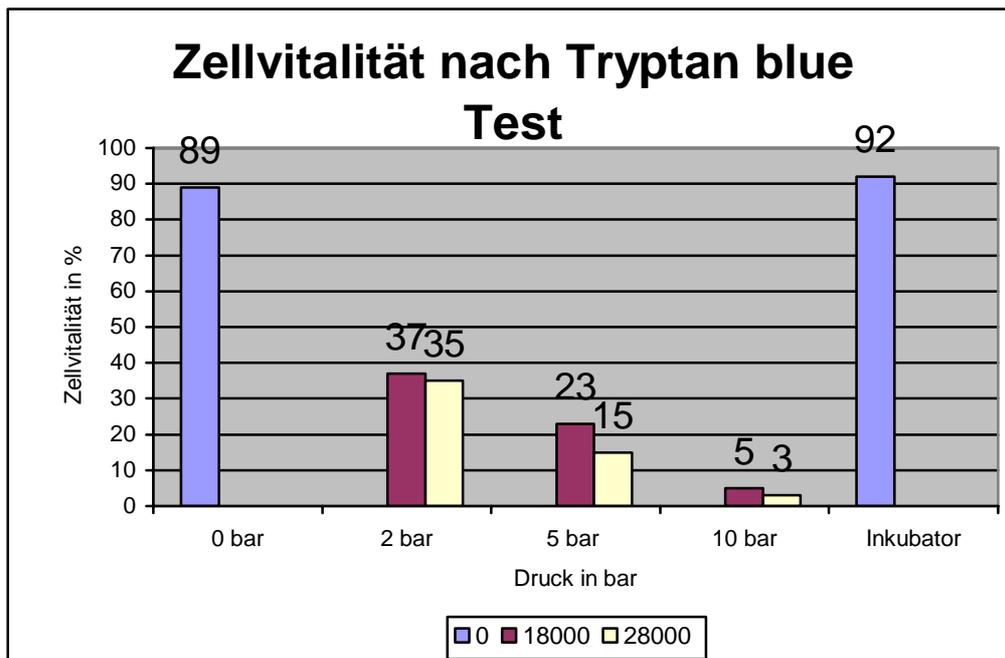


Abb. 3.8: Zellvitalität bei 0, 2, 5 und 10 bar und je 18000 bzw. 28000 Zyklen gemessen mit dem Tryptan blue Test

### 3.3.3 Glykosaminoglykan-Analyse

Die Glykosaminoglykan-Analyse aller besiedelten Scaffolds erbringt Werte im Bereich der unteren Nachweisgrenze. Dies gilt für die in dem Bioreaktor kultivierten Scaffolds, aber auch für die Scaffolds in einer regulären Zellkultur. Es zeigt sich kein Unterschied im GAG-Gehalt bei den verschiedenen Druckregimen. Der Anteil der GAG beträgt zwischen null und zwei Prozent an dem Gesamtscaffold. Auf eine statistische Auswertung wird bewusst verzichtet, da die Messgenauigkeit am Rand der Nachweisgrenze zu fehlerträchtig ist.

### 3.3.4 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Experimente mit zwei, fünf und zehn bar alternierendem Druck sind in Abb. 3.10 bis Abb. 3.21 dargestellt. Abb. 3.9 zeigt ein nicht besiedeltes Scaffold.

Das unbesiedelte Scaffold zeigt die Ausgangsstruktur der Kollagenmatrix (Abb.3.9).

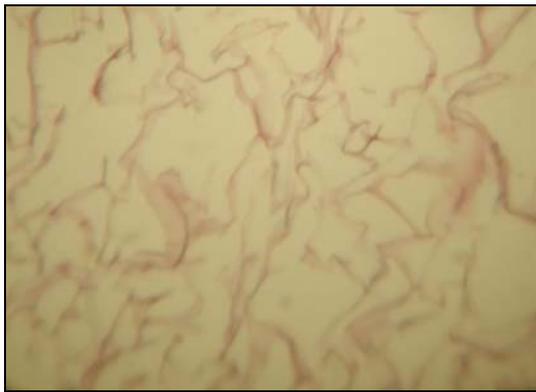


Abb. 3.9: Nicht besiedeltes Scaffold, Vergrößerung 20 fach

Bei Kultivierung der mit Fibrochondrozyten besiedelten Scaffolds über fünf Tage und atmosphärischem Druck sind fibrochondrozytentypische Zellen sichtbar. Diese sind angeheftet an die Kollagenmatrix. Ein Hof um die Zellen, der auf eine Matrixproduktion hinweist, ist nicht zu erkennen (Abb. 3.10, Abb. 3.11).



Abb. 3.10: 0 bar, 5 Tage, Vergrößerung 20 fach

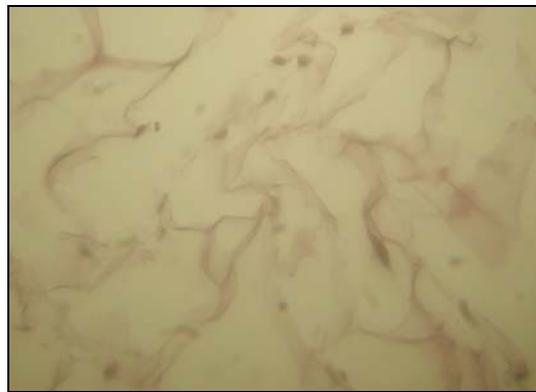


Abb. 3.11: 0 bar, 5 Tage, Vergrößerung 40 fach

Bei Kultivierung über fünf Tage und zwei bar alternierendem Druck sind bei 18000 und 28000 Zyklen vereinzelte Zellen mit fibrochondrozytentypischer Morphologie zu erkennen. Ein Zellhof ist nicht darzustellen. Das Kollagengerüst zeigt keinerlei Veränderung im Vergleich zum Ausgangszustand (Abb. 3.12, Abb. 3.13, Abb. 3.14, Abb. 3.15).

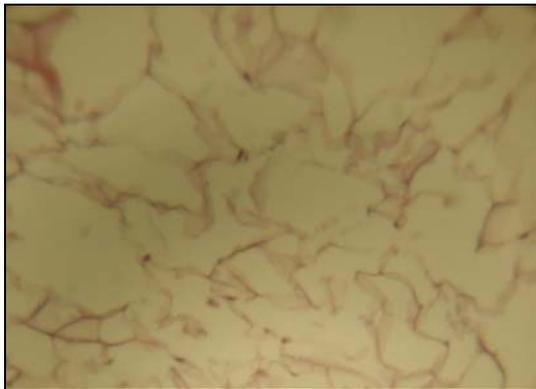


Abb. 3.12: Besiedeltes Scaffold 2 bar und 18000 Zyklen, Vergrößerung 20 fach

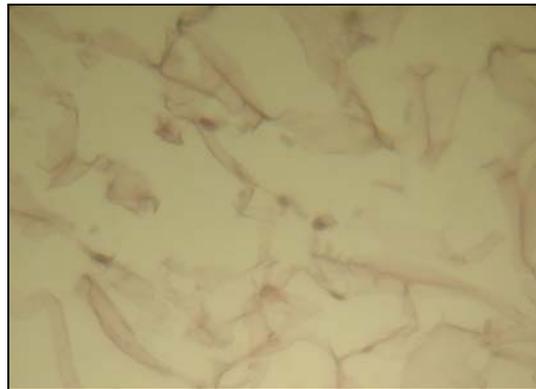


Abb. 3.13: Besiedeltes Scaffold 2 bar und 18000 Zyklen , Vergrößerung 40fach

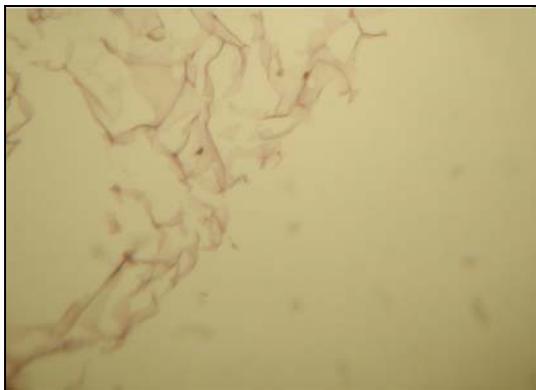


Abb. 3.14: Besiedeltes Scaffold 2 bar, 28000 Zyklen Vergrößerung 20fach



Abb. 3.15: Besiedeltes Scaffold 2 bar, 28000 Zyklen, Vergrößerung 40 fach

Bei Kultivierung über fünf Tage und fünf bar alternierendem Druck sind bei 18000 und 28000 Zyklen vereinzelt Zellen zu erkennen. Die fibrochondrozytentypische Morphologie ist nicht sicher nachzuweisen. Ein Zellhof ist nicht darzustellen. Das Kollagengerüst zeigt keinerlei Veränderung im Vergleich zum Ausgangszustand (Abb. 3.16, Abb. 3.17, Abb. 3.18, Abb. 3.19).

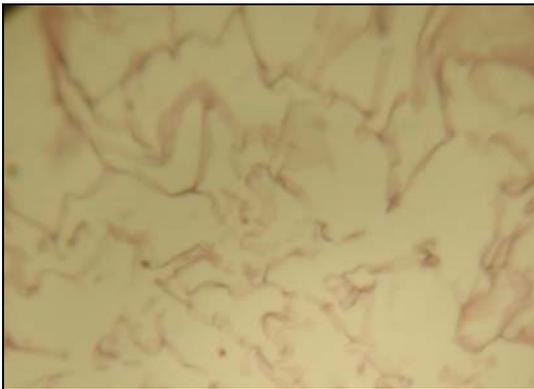


Abb. 3.16: Besiedeltes Scaffold 5 bar, 18000 Zyklen, Vergrößerung 20 fach

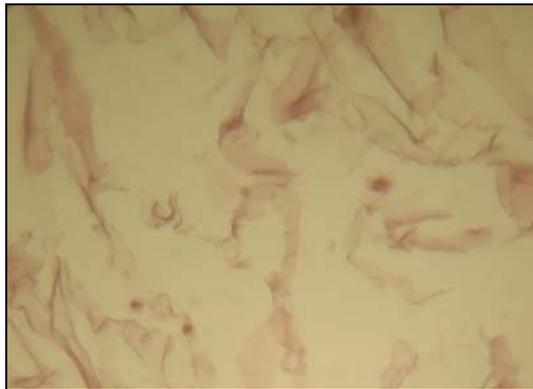


Abb. 3.17: Besiedeltes Scaffold 5 bar, 18000 Zyklen, Vergrößerung 40 fach

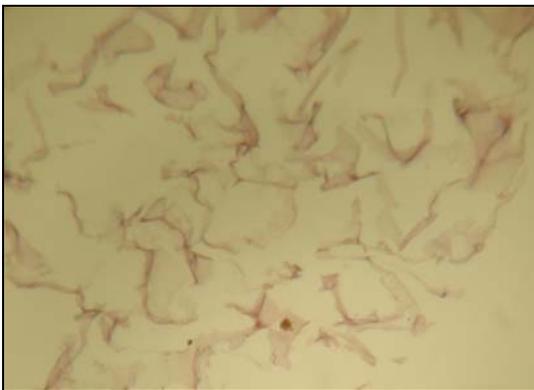


Abb. 3.18: Besiedeltes Scaffold 5 bar, 28000 Zyklen, Vergrößerung 20 fach

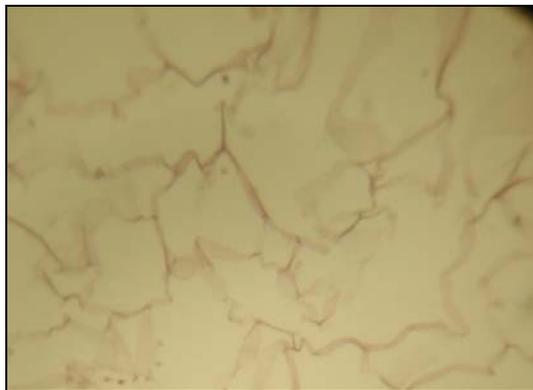


Abb. 3.19: Besiedeltes Scaffold 5 bar, 28000 Zyklen, Vergrößerung 40 fach

Bei Kultivierung über fünf Tage und zehn bar alternierendem Druck sind bei 18000 und 28000 Zyklen keine Zellen sicher abzugrenzen. Die Kollagenstruktur ist weitgehend identisch mit der Ausgangsstruktur. Eine Kontamination ist nicht zu erkennen (Abb. 3.20, Abb. 3.21).

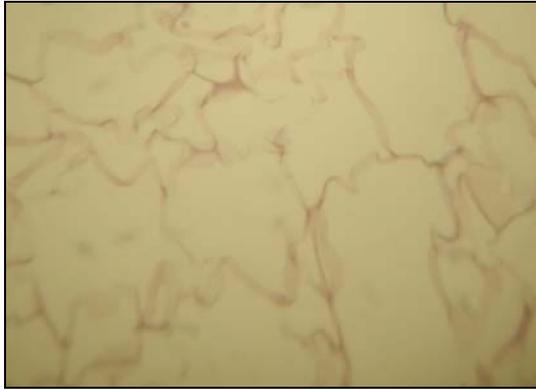


Abb. 3.20: Besiedeltes Scaffold 10 bar, 18000 Zyklen , Vergrößerung 40fach



Abb. 3.21: Besiedeltes Scaffold 10 bar, 28000 Zyklen, Vergrößerung 20 fach

Insgesamt ist eine deutliche Abnahme der Zellzahl bei steigendem intermittierend hydrostatischem Druck sichtbar. Eine Veränderung der Gerüstmatrix ist hingegen nicht zu beobachten. Auch bakterielle oder mykotische Kontaminationen sind nicht zu erkennen.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Zellkultur**

Aus steril gewonnenen Schafsmenisci können Fibrochondrozyten isoliert und kultiviert werden. Wie in der Literatur vorbeschrieben, ändert sich die Proliferationsrate und fibrochondrozytenspezifische Morphologie in einer zweidimensionalen, wie auch in einer dreidimensionalen Kultur, wie der verwendeten Kollagenmatix, nicht wesentlich.

Auch eine Kryokonservation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und anschließende Rekultivierung führt zu keiner Änderung der Proliferationsrate oder Morphologie.

Eine Integration der Fibrochondrozyten in das Kollagen-resorb-scaffold ist nach vier Tagen erreicht.

### **4.2 Bioreaktor**

#### 4.2.1 Bedeutung eines Bioreaktors in der Zellkultur

Bioreaktoren werden im Allgemeinen als Maschinen, in denen biologische und/oder biochemische Prozesse unter kontrollierten Bedingungen stattfinden, definiert. Bioreaktoren werden unter anderem in der Herstellung von rekombinanten Proteinen (z.B. Antikörper, Wachstumsfaktoren) und in der industriellen Fermentation benutzt [Martin 2004].

Im Bereich des tissue engineering leisten Bioreaktoren unterschiedliche Aufgaben. Sie bieten konstante Kulturbedingungen. So können in der Regel die Temperatur, pH-Wert und Medium in engen Grenzen gehalten werden. Darüber hinaus müssen beim functional tissue engineering physikalische Stimuli erzeugt werden können. Eine Prämisse des functional tissue engineering ist es, dass die Wachstumsrate und –geschwindigkeit erhöht werden kann, wenn in vitro in vivo-Bedingungen nachgestellt werden [Butler 2000]. Ahsan et al zeigten, dass Standard-Langzeit-Kulturen bis zu 12 Monate weder die Materialeigenschaften der dynamisch belasteten Kulturen noch die des Ausgangsgewebes erreichen [Ahsan 2003].

Bioreaktoren bieten Zellen möglichst optimale Wachstumsbedingungen. Dadurch wird es vielleicht möglich sein, biomechanisch hochwertige Implantate zu erzeugen [Butler 2000].

#### 4.2.2 Der neu entwickelte Bioreaktor DPR50

Der neu entwickelte Bioreaktor DPR50 erfüllt die Anforderungen des functional tissue engineering. Er besteht ausschließlich aus inerten Materialien, das heißt der gesamte Bioreaktor gibt keine zelltoxischen Stoffe ab. Dies konnte durch verschiedene Experimente ohne alternierenden Druck im Vergleich zur regulären Zellkultur nachgewiesen werden. Die Inertheit eines Bioreaktors ist die entscheidende Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Zellkultur.

Der Bioreaktor DPR50 bietet die Möglichkeit die elementaren Kulturbedingungen zu regulieren. PH-Wert und Temperatur sind in engen physiologischen Grenzen konstant. Der Mediumflow ist variabel. Aufgezeichnet und visualisiert werden kontinuierlich der Temperaturverlauf und der Druckzyklus.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit einen physikalischen Stimulus, nämlich intermittierend hydrostatischen Druck auf Zellen ausüben zu können. Hierbei sind die Frequenz und der ausgeübte Druck variabel. Dadurch ist es möglich, eine Vielzahl unterschiedlicher Szenarien mit dem Reaktor DPR50 zu simulieren und dadurch das zelluläre Verhalten auf den applizierten Druck zu beobachten.

Der DPR50 ist im Vergleich zu anderen medizintechnischen Produkten mit 700 Euro Anschaffungskosten sehr günstig. Dies gilt auch für die laufend anfallenden Kosten.

Der Reaktor erfüllt damit alle notwendigen Voraussetzungen für das functional tissue engineering. Dennoch ist für weitere Experimente eine Weiterentwicklung des DPR50 empfehlenswert. Nachfolgend sind Probleme und die daraus notwendigen Modifikationen erläutert.

##### 4.2.2.1 Temperatur

Anfangs traten größere Temperaturschwankungen in dem Bioreaktor auf. Im Rahmen der Ventilbewegungen entsteht Reibungswärme. Diese führt zu einem Anstieg der Temperatur während der Belastungszyklen und entsprechend zu einem Abfall während der Ruhephasen. Dies konnte durch bauliche Veränderung der Isolierung minimiert werden.

#### 4.2.2.2 PH-Wert

Der ermittelte pH-Wert von  $7,4 \pm 0,1$  ist im Vergleich zu den in vitro Regulationsmechanismen mit einem Blut-pH von  $7,4 \pm 0,04$  fast um eine Zehnerpotenz variabler. Dies kann durch Zugabe eines sensibleren Puffers verringert werden.

#### 4.2.2.3 Kontaminationen

Trotz Einhaltung höchster hygienischer Standards (steriles Arbeiten, Sterilisieren aller Materialien inklusive aller benötigten Werkzeuge) kam es wiederholt zu Kontaminationen des Bioreaktors mit Pilzen. Um diese Kontaminationen zu verhindern und unter Kontrolle zu bringen, wird bei jedem Versuch Amphotericin B in einer Konzentration von 2,5 mg/l zu gegeben. Trotz der Zugabe von Amphotericin B kam es rezidivierend zu Kontaminationen, die zum Abbruch des Experimentes führten.

#### 4.2.2.4 Lärmbelastung

Durch den schnellen Druckwechsel entsteht bei jedem Druckaufbau und vor allem bei jedem Druckabbau ein lautes Pfeifen. Dies kann dadurch reduziert werden, dass der Druckablass in ein Wasserbassin geleitet wird.

#### 4.2.2.5 Bauliche Frequenzlimitation des DPR50

Die Variabilität des Druckregimes ist durch eine Frequenz von maximal zwei Hz begrenzt. Dies liegt zum einen an den eingesetzten Materialien, z.B. an der Trägheit der Ventile, Abweichungen des Multimeters, Refraktärzeit der Pumpe, zum anderen an dem Querschnitt der Druckleitung und des Diffusors. Somit ist eine Frequenz von zwei Hz zu erreichen, bei höheren Frequenzen ist mit einer erhöhten Unschärfe zu rechnen. Minimal sind der Frequenz keine Grenzen gesetzt.

#### 4.2.2.6 Materialermüdung

Die größte Problematik des Bioreaktors DPR50 besteht in der mangelnden Haltbarkeit einzelner Bauteile. Diese sind in erster Linie durch Materialfehler und nicht durch die Konstruktion bedingt. Im Einzelnen traten folgende Fehler auf:

##### 1) Leckagen der Mediumschläuche

Trotz der relativ niedrigen Druckbelastung in den Mediumschläuchen kam es zu Leckagen in den Schläuchen und in den Verbindungsstücken. Von einer Wiederverwendung einmal benutzter Schläuche musste Abstand genommen werden.

##### 2) Fehlerhafte Dichtungen

Zu Beginn wurden mehrmals Dichtungen undicht. Dieses Problem wurde mit speziellen Dichtungen, die bis zu 100 bar Druckfestigkeit garantieren, behoben.

##### 3) Silikonmembran

Es kam häufig zu Rissen der Silikonmembran. Zum einen traten diese Risse als indirekte Folge anderer Defekte auf (z.B. durch Schlauchbruch, der zu einem erniedrigten Mediumspiegel führte und somit eine größere Auslenkung der Membran verursachte), zum anderen als direkte Folge kleinster vorbestehender Risse der Membran. Deswegen wurde zur Verringerung von Komplikationen für jeden Versuch eine neue Membran zugeschnitten und autoklaviert.

##### 4) Ventil

Durch Qualitätsmängel bedingt und verstärkt durch die sehr hohen Wechselbelastungen, kam es zu einem Versagen eines Ventils. Dies führte zum Abbruch der Experimente.

## 4.3 Experimente

### 4.3.1 Bedeutung der intermittierend hydrostatischen Druckpulsation - Stand der Forschung

Der Einfluss von intermittierend hydrostatischer Druckpulsation auf Zellpopulationen wurde bisher überwiegend an hyalinem Knorpel der Gelenkflächen untersucht.

Nach Ateshian und Hung ist hydrostatischer Druck einer der wichtigsten physikalischen Kräfte, die auf Chondrozyten wirken können [Ateshian 2003]. Mauck et al konnte zeigen, dass die Kombination von physikalischem Stimulus und Wachstumsfaktoren gegenüber den Einzelfaktoren in ihrer matrixproduzierenden Wirkung überlegen sind [Mauck 2003].

Li et al konnten die Überlegenheit des intermittierenden Druckes gegenüber einer statischen Belastung demonstrieren. Danach blockiert ein statischer Druck von 84 kPa über 24 Stunden die Synthese von Glykosaminoglykanen und DNA, hingegen steigert ein Druck von 200 kPa mit einer Frequenz von 0,01 Hz die Glykosaminoglykansynthese um 20 %.

Carver et al zeigte, dass intermittierender Druck von 3,44 MPa und 6,87 MPa zu einer erhöhten Matrixproduktion, also der Produktion von Kollagenen und Glykosaminoglykanen, führt. Allerdings zeigten sie auch, dass die Zellkonzentration und Proliferation niedriger als bei der Kontrollgruppe ist [Carver 1999].

Ikenoue et al zeigten eine Abhängigkeit der Matrixproduktion von der Frequenz und Dauer des intermittierend zugeführten Druckes. Druck von 1, 5 MPa und 10 MPa bei 1 Hz wurden für 4 Stunden pro Tag ausgeübt. Nach einem bzw. vier Tagen wurden die Zellscaffolds untersucht. Dabei zeigte sich, dass vier Stunden Druck an einem Tag zu keiner veränderten Matrixproduktion führt. Allerdings steigert der applizierte Druck über vier Stunden an vier aufeinander folgenden Tagen die Kollagensynthese um das 1,4 bis 1,9 fache [Ikenoue 2003].

Bisher konnte auch gezeigt werden, dass die Ausschüttung von TGF- $\beta$  durch einen intermittierenden Druck von ein bis fünf MPa gesteigert werden kann. Hingegen führt ein intermittierender Druck von 50 MPa zu einer gesteigerten Ausschüttung des heat shock protein 70 [Takahashi 1997].

Diese auf hyalinem Knorpel basierenden Ergebnisse können nicht ohne weiteres auf den Meniskus, der aus Faserknorpel besteht, übertragen werden. Der Aufbau, die Struktur und die mechanischen Eigenschaften der beiden Knorpelarten differieren deutlich. Dennoch kann aber angenommen werden, dass physikalische Stimuli auch Fibrochondrozyten beeinflussen. So haben Imler et al. zeigen können, dass ähnlich dem Chondrozytenverhalten, Fibrochondrozyten auf eine statische Belastung mit einer Reduktion der Matrixproduktion reagieren [Imler 2004].

#### 4.3.2 Das verwendete Druckregime

Das verwendete Druckregime besteht aus einem Intervall von vier Minuten alternierendem Druck mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einem Ruheintervall von einer Minute Dauer. Dieses Druckregime wird über acht Stunden beibehalten. Im Anschluss folgt ein vierstündiges Ruheintervall mit anschließender Wiederaufnahme des Druckregimes.

Dieses Programm ist an die natürliche Bewegung eines Schafes angelehnt. 0,5 Hz entsprechen in Näherung dem langsamen Trott eines grasenden Schafes, das intermittierend stehen bleibt. Ruhezeiten folgen hierbei auch in der freien Natur.

Die Bewegung des Schafes hat ebenso eine Erwärmung zur Folge wie die mechanische Ventilbewegung des Bioreaktors DPR50. Beides erfolgt im physiologischen Rahmen.

#### 4.3.3 Einfluss des Bioreaktors DPR50 auf Fibrochondrozyten

##### 4.3.3.1 Rekultivierung

Mit der Rekultivierung von Zellen, die aus zuvor besiedelten Scaffolds gewonnen werden, wird der Anteil der wiederanzüchtbaren Zellen an den zuvor eingesetzten bestimmt. Jedes Scaffold wird mit zwei Millionen Fibrochondrozyten inkubiert.

In den Vorversuchen zeigt sich, dass der Anteil rekultivierbarer Zellen aus Scaffolds, die im Bioreaktor ohne Druckpulsation kultiviert wurden, nämlich 88 %, dem Anteil nach regulärer Zellkultur mit 87 % nahezu identisch ist. Dabei ist zu beachten, dass die Rekultivierungsphase auch mit einer Zellvermehrung einhergeht. Dem gegenüber stehen Zellverluste bei der Isolierung der Fibrochondrozyten aus den Scaffolds entgegen. In diesem Umstand ist die Ursache zu suchen, dass weniger Zellen isoliert und rekultiviert werden können als ursprünglich eingesetzt wurden. Durch das nahezu identische Verhalten der beiden Zellreihen folgt, dass der Bioreaktor der regulären Zellkultur ähnliche Kulturbedingungen bereitstellt. Der Bioreaktor DPR50 kann somit zur Kultur von Fibrochondrozyten verwendet werden.

Die durchgeführten Experimente zeigen den Einfluss des intermittierend hydrostatischen Drucks auf die Rekultivierungsrate der eingesetzten Fibrochondrozyten. Bei zwei bar alternierendem Druck können 86 % bei 18000 Zyklen bzw. 83 % bei 28000 Zyklen rekultiviert werden. Bei Steigerung des Drucks sinkt die Rate deutlich ab, so sind bei fünf bar alternierendem Druck 45 % bzw. 18 % zu rekultivieren, bei zehn bar alternierendem Druck nur noch 4 % bzw. 1 %. Es zeigt sich demnach eine signifikante Abnahme des Rekultivierungsverhältnisses bei Steigerung des Drucks oder der Zyklenanzahl.

#### 4.3.3.2 Vitalitätsprobe nach dem Tryptan blue Test

Der Tryptan blue Test ermittelt den Anteil an vitalen Zellen an der Gesamtheit der aus dem Scaffold isolierten Zellen. In der Kontrollgruppe der im Bioreaktor DPR50 und im Inkubator kultivierten Populationen ergibt sich ein Anteil der vitalen Zellen von 89 % versus 92 %, was wiederum belegt, dass die Kulturbedingungen ähnlich sind.

Es zeigt sich das bei zwei bar alternierendem Druck 37 % bei 18000 Zyklen bzw. 35 % bei 28000 Zyklen vitale Zellen darstellen. Bei Steigerung des Drucks oder der Zyklenzahl nimmt die Zahl der vitalen Zellen deutlich ab, so sind bei fünf bar alternierendem Druck 23 % bzw. 15 %, bei zehn bar alternierendem Druck nur noch 5 bzw. 3 % vitale Zellen.

Hierbei ist zu beachten, dass nicht vitale Zellen eine geringere bis keine Adhärenz an das Kollagenscaffold haben. Diese Zellen werden teilweise im Laufe eines Experimentes aus dem Trägergerüst geschwemmt. Die ausgeschwemmten Zellen werden in dieser Vitalitätsprobe nicht erfasst. Nur Zellen, die vital waren und schon eine ausreichende Verknüpfung mit dem Kollagen-resorb-scaffold eingegangen sind, werden mit diesem Test erfasst.

#### 4.3.3.3 Glykosaminoglykan-Analyse

Der Glykosaminoglykangehalt aller untersuchten Scaffolds, also der im Bioreaktor DPR50 sowie der in regulärer Zellkultur kultivierten Scaffolds liegt im unteren Bereich der Nachweisgrenze. Insgesamt werden Werte zwischen null und zwei Prozent Glykosaminoglykane an dem Gesamtscaffold gemessen. Es ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Druckregimen erkennbar. Sicherlich ist dies mit genaueren Messmethoden zu überprüfen. Insgesamt lässt sich kein positiver oder negativer Einfluss des intermittierenden hydrostatischen Druckes auf die Matrixproduktion der Fibrochondrozyten nachweisen.

#### 4.3.3.4 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Experimente bei zwei, fünf und zehn bar alternierendem Druck zeigen eine deutliche Abnahme der Zellzahl bei Steigerung des Druckes oder der einwirkenden Dauer. Dies ist eine Übereinstimmung mit den Analysen nach der Reaktivierungsmethode und dem Tryptan blue Test. Eine Veränderung der Gerüstmatrix ist hingegen nicht zu beobachten. Auch bakterielle oder mykotische Kontaminationen sind nicht zu erkennen.

#### 4.3.4 Gründe für den beobachteten Zellrückgang

Der Rückgang der Zellvitalität, -population und der Matrixproduktion ist möglicherweise ein Resultat einer Vielzahl von Einzelfaktoren, wie Alter der Schafe, der Frequenz und Höhe der Pulsation, Überbeanspruchung und Ausschwemmung.

##### 1) Alter der Schafe

Es ist bekannt, dass die mechanischen und biochemischen Eigenschaften, wie auch das Ansprechverhalten von Chondrozyten auf Wachstumsfaktoren mit dem Alter der Tiere variiert [Mauck 2003, Nixon 1998, Williamson 2001]. Es können ebenfalls auch altersabhängige Unterschiede in dem Ansprechverhalten auf mechanische Stimuli bestehen [Mauck 2003]. Carver et al beschreiben, dass Zellen von Jungtieren eine höhere Matrixproduktion aufweisen als Zellen alter Tiere [Carver 1999].

Die in dieser Studie eingesetzten Schafe waren mit durchschnittlich 8 Jahren sehr alt. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Zellproliferation und vor allem die Matrixproduktion bei Einsatz von Fibrochondrozyten, die von jüngeren Tieren gewonnen wurden und unter ähnlichen Versuchsbedingungen kultiviert werden, gesteigert werden kann. Dies ist in weiteren Studien zu untersuchen.

##### 2) Frequenz

Eine Änderung der Proteoglykansynthese ist von der Höhe und Frequenz des applizierten intermittierend hydrostatischen Drucks abhängig [Guilak 1997]. Nach Guilak gilt im allgemeinen, dass niedrige Frequenzen zu einer Suppression der Proteoglykansynthese führen, schnellere Frequenzen hingegen eine erhöhte Proteoglykansynthese zur Folge haben [Guilak 1997]. Davisson et al beschreiben, dass Frequenzen kleiner als 0,0001 Hz keinen Einfluss auf die Matrixproduktion haben, hingegen Frequenzen von 0,01 Hz oder höher zu einem Anstieg von bis zu 10-30 % führen. Sie fanden ein matrix-stimulierendes Maximum bei 0,1 Hz [Davisson 2002].

Häufig wird eine Frequenz um 1 Hz benutzt, die eine Annäherung an physiologische Bedingungen darstellt. In der vorliegenden Studie wurde eine Frequenz von 0,5 Hz gewählt. Daraus folgt, dass alle zwei Sekunden ein Druck aufgebaut wird. Diese Frequenz kann durchaus als physiologisch, z.B. beim Grasens eines Schafes, angesehen werden. Die Auswirkung einer Frequenzmodulation ist in weiteren Studien zu untersuchen.

### 3) Beobachtungszeitraum

Hung et al fanden, dass es erst nach einem Kulturzeitraum von über 14 Tagen zu einer deutlichen Verbesserung der Materialeigenschaften zwischen dynamisch belasteten und unbelasteten Chondrozytenkulturen kommt [Hung 2004]. Allerdings verwendete die Arbeitsgruppe ein Belastungsprogramm von nur drei Stunden täglich bei einer Frequenz von einem Hz und einem Druck bis 10 % Deformierung des Ausgangsmaterials. Nachdem in der vorliegenden Studie ein Rückgang der Zellmasse nach 16-stündigem Belastungszyklus über fünf Tage beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums nicht zu einer Verbesserung der Struktur der besiedelten Kollagenmatrices führt.

### 4) Überbeanspruchung

In vivo-Studien mit Minder- und/oder Überbeanspruchung, in denen Gelenke entweder immobilisiert oder wechselnden Belastungsmustern und –ausmaß durch eine Meniskektomie unterzogen wurden, zeigen, dass Abweichungen von physiologischen Belastungsmustern zu einer Verschlechterung der Materialbeschaffenheit und der biochemischen Zusammensetzung des Gelenkknorpels führt [Haapala 2000, LeRoux 2000, Mauck 2003, Setton 1997]. So beschreibt Mauck et al, dass Druck mit einer Deformierung des Ausgangsmaterials bis 10 % mit 1 Hz über drei Stunden täglich einen Monat lang, zu einer Zunahme der biochemischen Zusammensetzung und Vernetzung in Chondrozyten besiedelten Agarose-Hydrogel führt [Mauck 2003]. Dies wurde für Chondrozyten belegt, für Fibrochondrozyten fehlen dazu bisher Studien.

Die vorliegende Studie arbeitet mit Druck von 2, 5 und 10 bar, einer Frequenz von 0,5 Hz und einem Druckzyklus von bis zu 28000 Zyklen. Eine Steigerung des intermittierend hydrostatischen Drucks führt unter anderem zu einer Reduktion der Zellmasse. Eventuell ist dies durch eine Überbeanspruchung der Zellpopulation zu erklären.

### 5) Zellausschwemmung

Durch die hohen Wechselbelastungen, gerade bei hohen Drucken, die auf das Kollagengerüst und die inkubierten Fibrochondrozyten wirken, besteht die Möglichkeit, dass ungenügend verankerte Zellen aus der Kollagenmatrix gelöst werden. Allerdings konnten keine Zellen in dem verwendeten Medium nachgewiesen werden. Trotzdem ist diese Möglichkeit durch weitere Studien zu überprüfen. Ein Ansatz hierfür ist ein langsam progredienter Druckaufbau, wodurch den Fibrochondrozyten eventuell eine bessere Vernetzung ermöglicht wird.

#### 4.4 Schlussfolgerung

Der neuentwickelte Bioreaktor DPR50 kann die geforderten Standardkulturbedingungen erfüllen. Darüber hinaus ist es mit ihm möglich, wechselnde Belastung in Form eines intermittierend hydrostatischen Drucks auf Zellpopulationen auszuüben. Eine Modulation der Druckhöhe und Frequenz sind möglich. Die kontinuierliche Messung des Druck- und Temperaturverlaufs mit anschließendem Export an eine Recheneinheit zur Visualisierung und Aufzeichnung sind ebenfalls möglich. Die Hauptproblematik des Bioreaktors DPR50 liegt in der mangelnden Haltbarkeit der Einzelteile, insbesondere der Ventile und der Silikonmembran. Möglicherweise kann hier ein Wechsel auf andere Fabrikate eine Verbesserung bringen. Ein weiteres Manko sind rezidivierende Kontaminationen, die auch nach Zugabe von Amphotericin B und Penicillin-Streptomycin zu häufigen Abbrüchen der Experimente führten. Insgesamt musste mehr als jedes zweite Experiment aus vorgenannten Gründen abgebrochen werden.

Die zur Auswertung kommenden Experimente belegen einen deutlichen Rückgang der Zellvitalität, der Zellpopulation und der Matrixproduktion in Abhängigkeit von der Intensität der Belastung. Es zeigt sich eine Abnahme der vitalen Zellen je größer der einwirkende Druck und/oder die Zyklenanzahl ist. Der Anteil der vitalen Zellen sinkt von 89 % ohne Druckpulsation auf 3 % bei 10 bar und 28000 Zyklen. Ebenso ist bei der histologischen Aufarbeitung ein Rückgang der Fibrochondrozytenpopulation in der Scaffoldmatrix bei steigendem Druck oder Zykluszahl zu erkennen. Die Matrixproduktion, die exemplarisch anhand der Glykosaminoglykane überprüft wurde, kann mittels des DPR50 und des eingesetzten Druckverlaufs (0 bis 10 bar, 0,5 Hz, bis 28000 Zyklen) ebenfalls nicht gesteigert werden. Die Glykosaminoglykan-Analyse zeigt Werte an, die im Bereich der Nachweisgrenze liegen und gibt keinerlei Hinweise auf einen positiven oder negativen Einfluss des intermittierend hydrostatischen Druckes.

Insgesamt konnte ein positiver Effekt des intermittierend hydrostatischen Drucks nicht belegt werden und damit ist ein klinischer Einsatz einer möglichen Weiterentwicklung des DPR50 derzeit unwahrscheinlich. Allerdings besteht weiterer Forschungsbedarf. Unter anderem sind die Einflüsse einer Frequenzmodulation, eines geänderten Druckschemas, wie ein ansteigender Druck oder eine kontinuierliche Verlängerung der Belastungsphasen, zu untersuchen.

Schlussfolgernd steht Aufwand und Outcome in einem erheblichen Missverhältnis, so dass ein klinischer Einsatz derartiger Techniken noch in weiter Ferne liegt.

## 5. Zusammenfassung

Die Menisci sind für die biomechanischen Eigenschaften des Kniegelenks von immenser Bedeutung. Sie wirken als Stoßdämpfer, als Gleitlager und als Stabilisatoren. Bei Verletzungen zeigen sie jedoch, bedingt durch ihre vorwiegend avaskuläre Struktur, so gut wie keine Regenerationsfähigkeit. Die Therapieoptionen bei Meniskuspathologien sind beschränkt. Unter anderem stehen die Meniskusnaht, die Teil- oder Totalresektion und die Implantation von Allograft-Transplantaten oder künstlichem Meniskusersatz zur Verfügung. Das functional tissue engineering versucht mit dem interdisziplinären Einsatz der Biowissenschaften und des Ingenieurwesens eine physiologische Umgebung nachzubilden. Dies soll zu einer Verbesserung der biochemischen, physikalischen und mechanischen Eigenschaften künstlicher Meniskusimplantate führen. Ein physiologischer Parameter ist der alternierende Druck, der auf den nativen Meniskus wirkt. Durch diesen Stimulus sollen Fibrochondrozyten zu einer gesteigerten Proliferation und vor allem zu einer gesteigerten Matrixexpression angeregt werden.

Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss intermittierend hydrostatischen Drucks auf Fibrochondrozyten. Hierzu wurde ein Bioreaktor konstruiert, der über die Standardkulturbedingungen hinaus, wechselnde Druckbelastungen auf Meniskuszellen applizieren kann. Anschließend wurde der Einfluss dieses Stimulus auf die Fibrochondrozytenpopulation und deren Matrixexpression untersucht. Dafür wurden Serien mit 0, 2, 5 und 10 bar alternierendem Druck mit 18000 bzw. 28000 Zyklen durchgeführt.

Ein Einfluss intermittierend hydrostatischen Drucks auf Fibrochondrozyten wird durch die Studie nachgewiesen. Es kommt zu einer signifikanten Abnahme der Population bei steigender Belastung. Gründe für den beobachteten Rückgang können die Frequenz und die Höhe des aufgebrachten intermittierenden Drucks sein. Die Wirkung einer Veränderung dieser Variablen ist in weiteren Studien zu untersuchen.

Ein Hauptziel dieser Arbeit einen funktionstüchtigen Bioreaktor für das functional tissue engineering zu konstruieren, wurde mit dem Bioreaktor DPR50 erreicht. Der physiologische Parameter Druck wird über eine Pneumatik hydrostatisch erzeugt. Physiologische Belastungswechsel können durch intermittierend hydrostatischen Druck nachempfunden werden. Parameter wie Frequenz und Höhe des applizierten Druckes sind variabel. Für den Einsatz im klinischen Alltag ist der Bioreaktor derzeit noch zu störanfällig. Eine

Weiterentwicklung des Bioreaktors ist vor allem in Bezug auf die Haltbarkeit der eingesetzten Membran und der Druckventile notwendig. Problematisch ist vor allem der hohe Verschleiß der eingesetzten Membran. Diese stellte sich im Verlauf der Experimente als nicht robust genug heraus, um mehrmals eingesetzt werden zu können. Hier kann möglicherweise eine Änderung des Materials zu einer deutlich verlängerten Haltbarkeit bei gleich bleibender Funktionalität führen. Die Ventile sind ebenfalls durch die häufigen Lastwechsel in ihrer Haltbarkeit eingeschränkt. Hier kann ein Ausweichen auf andere Hersteller oder ein regelmäßiger Austausch, z.B. nach 100.000 Zyklen, die Stabilität des Bioreaktors eventuell erhöhen.

Auf dem Weg zu einem suffizienten und nicht immunogenen Meniskusimplantat sind noch einige Hürden die bewältigt werden müssen. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Bioreaktor ist ein viel versprechender Ansatz, weitere Studien müssen folgen. Insgesamt ist der apparative sowie personelle Aufwand nur im Rahmen weiterer Grundlagenforschung zuleisten. Ein rascher Transfer in die klinische Anwendung erscheint derzeit nicht realisierbar.

## **6. Anhang**

### **6.1 Gerätschaften**

Inkubator Shaker mit 37° C (New Brunswick Scientific: innova 4200)

Kulturschrank mit 37° C (Heraeus)

Zentrifuge (Hettich: Rotina 48 R)

Sterile Hood (Heraeus)

Unterdruckabsauger

Neubauer Zählkammer

Kühlschrank 8° C

Gefrierschrank -80° C (Heraeus)

Pumpe (Ismatec: IPC; High Precision Multichannel Dispenser)

Digital Multimeter (Votcraft; Digital Multimeter VC 820) mit optischer Schnittstelle

Computer (Windows XP) mit Schnittstelle

Steuergerät (Siemens Logo! 230 RC)

Minuth Zellkammer

Bioreaktor

Siliconmembran

Druckventile

Dichtungen

Verbindungsschläuche

Heizplatte (Störk: Tronic)

pH-Meter (WTW: pH 537)

Drucksensor (Norgren Herion: Drucksensor Baureihe 18S Allfluid)

Digital-Präzisionsthermometer (Greisinger: GTH 175/MOP)

Votcraft PS 152 A

Votcraft PS 302 A

Schüttler (Heidolph: REAX top)

Mikroskop (Olympus: SK 30)

Autoklav

Bohrmaschine

Bohrer

Trennschleifer

Schraubenschlüssel

## Blyscan Sulfated Glykosaminoglykan Assay Kit

### 6.2 Verbrauchsmaterialien

Glaspipetten

Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml)

TRP Zellkulturschalen (60 x 15 mm (9360); 100 x 20 mm (93100))

TRP Zellkulturflaschen

Tubes (50 ml)

TRP Zentrifugenröhrchen

TRP Zellkultur Testplatten

Kryoampullen

Lohmann Rauscher Gazin (REF: 13621)

Skalpelle (no 22)

Pinzetten

Spritzen (1 ml, 2 ml)

Kanülen (27G<sup>3/4</sup>)

Clinico Spritzpumpenleitung (REF: 78415200)

Infusionsbesteck

Ethicon Ethibond Excel 3 (EH6458)

Resorba CLINICARE GmbH Kollagen-resorb (REF: RK-9001)

Biochrom AG Dulbecco's MEM (Cat. No. FG 0435) (DMEM)

Biochrom AG PBS-Dulbecco (Cat. No. L 1825)

FCS (Fetal calve serum)

DMSO

Guanedin-HCL

6-Aminohexanonic Acid

Na<sub>2</sub>EDTA

Sodiumacetat

Biochrom AG Trypsin/EDTA Solution (Cat. No. L 2163)

Glutamin

Penicillin-Streptomycin

Roche Collagenase A (103586)

Sigma Bufferall (B8405)

Bristol-Meyers Squibb Amphotericin B

Sigma Trypan blue solution (0,4 %) (T8154)

Otto Fischer GmbH & Co. KG Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7 % (CH.-B.: 6392092)

### 6.3 Feste Kombinationen

#### Komplettmedium I

Das unter sterilen Bedingungen gemischte Komplettmedium besteht aus 500 ml Dulbecco's MEM, 50 ml FCS, 15 ml Glutamin und 15 ml Penicillin-Streptomycin-Gemisch.

Das Komplettmedium wird bei 8° C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wird es etwa eine Stunde bei 37° C im Wasserbad erwärmt.

#### Komplettmedium II

Komplettmedium II besteht aus dem Komplettmedium I und Amphotericin B aufgelöst in 5 % Glukoselösung, in einer Konzentration von 2,5 mg/l. Es wird bei 8° C im Kühlschrank aufbewahrt und vor dem Gebrauch etwa eine Stunde bei 37° C im Wasserbad erwärmt.

#### Kollagenase-Mediumgemisch

Das sterilgefilterte Kollagenase-Mediumgemisch besteht aus 10 mg Kollagenase in 30 ml Komplettmedium I.

#### Extraktionslösung der Glykosaminoglykananalyse

100 ml Extraktionslösung besteht aus 4 M Guanidine-HCl entsprechend 38,21 g, 0,1 M 6-aminohexanonic acid (1,57 g), 0,01 M Na<sub>2</sub> EDTA (0,37 g), 0,05 M sodium acetat (4,10 g).

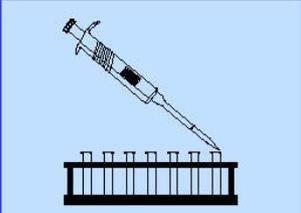
## 6.4 Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay

### Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay

**Assay Time:** one hour

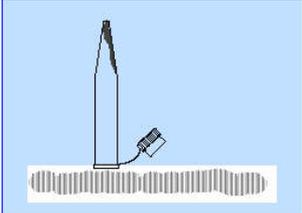
**Detection Limit:** 0.5 ug

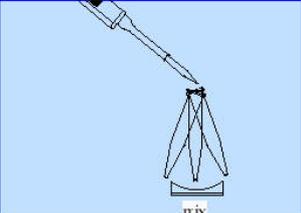
**Draining:**  
The unbound dye solution is removed by carefully inverting and draining the tubes. Any remaining droplets can be removed from the tubes by *gently* tapping the inverted tube on a paper tissue. Do not attempt to physically remove any fluid that is in close contact to the deposit.



**Set up assay:**  
Label a set of 1.5 ml microcentrifuge tubes. If sufficient material is available, run duplicate samples.  
Prepare:  
[1] Reagent blanks, (100 ul of distilled water or the test sample buffer).  
[2] Glycosaminoglycan standards, (aliquots containing 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 & 5.0 ug).  
[3] Test samples, (volumes: 10 to 100 ul).  
Adjust the contents of all tubes to 100 ul with distilled water or appropriate buffer.  
To each tube add 1 ml Blyscan dye reagent and cap all of the tubes..

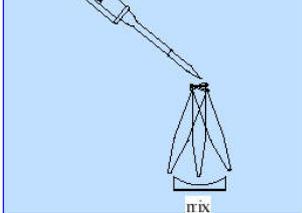
**Release of bound dye:**  
To each tube add 1 ml of the dissociation reagent.  
Re-cap the tubes and release the bound dye into solution. A vortex mixer is suitable. When the bound dye has been dissolved, usually within 10 minutes, the samples are ready for measurement.  
The colour is light stable, but should be read within 2 hours.  
Keep the tubes capped, until ready for measurement.

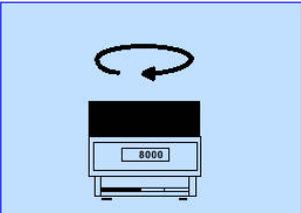




**Mixing:**  
Place tubes in a mechanical shaker for 30 minutes, (or manually shake at 5 minute intervals).  
During this time period the Blyscan dye will bind to sulfated glycosaminoglycans.  
The dye reagent is designed so that the sGAG-dye complex will precipitate out of solution.

**Measurement:**  
(a) Spectrophotometer, set wavelength to 656 nm.  
Use semi-micro glass, or plastic disposable, cuvettes.  
  
(b) Colorimeter, set using a red filter.  
Use semi-micro cuvettes or tubes.  
  
(c) Multiwell plate reader, set using a red filter.  
Transfer 200 ul aliquots of samples from tubes to the wells of a 96 well, multiwell plate.

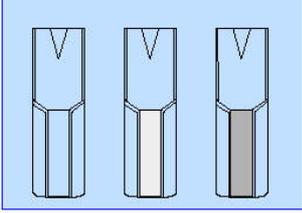




**Centrifuging:**  
Transfer the tubes to a micro centrifuge and spin the tubes at > 10000 x g for a 10 minute period.  
  
It is important to firmly pack the insoluble pellet of the sGAG-dye complex at the bottom of the tubes, so as to avoid any loss during draining.

Subtract the reagent blank reading from the standard and test sample readings. Check duplicates are within  $\pm 10\%$ .

Plot standards on graph and use the graph to calculate the sGAG content of the test samples, (see Blyscan Manual).



Anhang 6.1: Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay, biocolor, Irland

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Allen PR, Denham RA, Swan AV. Late degenerative changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* 1984;66:666-671
- [2] van Arkel ERA, de Boer HH. Human Meniscal Transplantation. *J Bone and Joint Surgery*. 1995;77-B:589-595
- [3] Ahsan T, Chen AC, Chin L, Wong VW, Bank RA, Verzijl N, Sah RL, Ratcliffe A. Effects of long term growth on tissue engineered cartilage. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 28, 309, 2003
- [4] Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med.* 10 (1982):90-95
- [5] Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *AM J Sports Med.* 11(1983):131-141
- [6] Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg. Am* 1988;70:1209-1217
- [7] Arnoczky SP, Adams ME, DeHaven K, Eyre DR, Mow VC. The Meniscus. Injury and Repair of the Muskuloskeletal Soft Tissue. *American Academy of Orthopaedic Surgeons.* 1988;487-537,
- [8] Arnoczky SP, Warren RF, McDevitt CA. Meniscal Replacment using a cryopreserved allograft. *Clin Orthop* 1990;252: 121-128
- [9] Arnoczky SP. Building a Meniscus. *Clin Orthop.* 1999;367: 244-253
- [10] Ateshian GA, Hung CT. Functional properties of native articular cartilage. *Functional Tissue Engineering*, edited by F. Guilak and D. Butler. New York, Springer, 2003

- [11] Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. In: Tissue Engineering of Cartilage and Bone. Novartis Foundation Symposium 249. Chair Caplan AI. John Wiley & Sons Ltd. 2003. 86-102
- [12] Bird MDT, Sweet MBE. Canals in the semilunar meniscus. Brief report. J Bone Joint Surgery B 1988;70:839
- [13] de Boer HH, Koudstaal J. Failed meniscus transplantation. A report of three cases. Clin Orthop 1994;306:155-62
- [14] Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RPH. Tissue engineering of the meniscus. Biomaterials 2004;25:1523-1532
- [15] Burr DB, Radin EL. Meniscal function and the importance of meniscal regeneration in prevention late medial compartment osteoarthritis. Clin Orthop 1982;171:121-126
- [16] Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: The role of Biomechanics. J. Biomech. Eng. 122, 570, 2000
- [17] Carver SE, Heath CA. Increasing Extracellular Matrix Production in Regenerating Cartilage with Intermittent Physiological Pressure. Biotechnology and Bioengineering. 1999;62:166-174
- [18] Carver SE, Heath CA. Influence of Intermittent Pressure, Fluid Flow, and Mixing on the Regenerative Properties of Articular Chondrocytes. Biotechnology and Bioengineering. 1999;65:274-281
- [19] Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagen in bovine menisci. Connect Tissue Res 1987;16:343-356
- [20] Collier S, Ghosh P. Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. Osteoarthritis Cartilage 1995;3:127-138

- [21] Cox JS, Nye CE, Schaefer WW, Woodstein IJ. The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dog's knee. *Clin Orthop* 1975;109:178-183
- [22] Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G. The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1985;1:58-62
- [23] Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *J. Orthop. Res.* 20, 2002, 842-848
- [24] DeHaven KE. The role of the meniscus. In: Ewing JW editor. *Articular cartilage and knee joint functions: basic science and arthroscopy*; New York: Raven Press Ltd; 1990 p. 103-15
- [25] Drenckhahn D, Zencker W. Benninghoff, *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, Urban & Schwarzenberg, München, Wien , Baltimore, 1994, 15 Auflage, S. 160-166; S. 360-361
- [26] Fairbanks TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* 1948;30:664-670
- [27] Fife RS. Identification of link proteins and a 116,000-dalton matrix protein in canine meniscus. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;240:682
- [28] Ghosh P, Taylor TKF. The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop.* 1987;224:52-63
- [29] Goto H, Shuler FD, Lamsam C, Moller HD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Transfer of lacZ marker gene to the meniscus. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:918-925
- [30] Green D, Ryan C, Malandrucolo N, Nadler HL. Characterization of the coagulant activity of cultured human fibroblasts. *Blood.* 1971 Jan;37(1):47-51
- [31] Guilak F, Butler DL, Goldstein SA. Functional Tissue Engineering: The role of Biomechanics in Articular Cartilage Repair. *Clin Orthop.* 2001;391S:295-305

- [32] Guilak F, Sah R, Setton L. Physical regulation of cartilage metabolism. In: Basic Orthopaedic Biomechanics, edited by Mowand C, Hayes WC. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997, pp. 179-207
- [33] Hall AC, Urban JP, Gohl KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res* 1991;9:1-10
- [34] Hamlet W, Liu SH, Yang R. Destruction of a cryopreserved meniscal allograft: A case of acute rejection. *Arthroscopy* 1997;13:517-521
- [35] Haapala J, Arokoski J, Pirttimaki J, Lyyra T, Jurvelin J, Tammi M, Helminen HJ, Kiviranta I. Incomplete restoration of immobilization induced softening of young beagle knee articular cartilage after 50-week remobilization. *Int. J. Sports Med.* 21,76,2000
- [36] Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989;3:2042-2051
- [37] Herman G, Berson BL. Discoid medial meniscus: Two cases of tears presenting as locked knee due to athletic trauma. *Am J Sports Med.* 1984 12:74
- [38] Hough AJ, Sokoloff L. Pathology of rheumatoid arthritis and allied disorders. In McCarty, D.J. (ed): *Arthritis and Allied Conditions*, ed 11. Philadelphia, Lea & Febiger, 1989, S.674
- [39] Hough AJ, Webber RJ, Pathology of the Meniscus, *Clin Orthop* 1990;252:32-40
- [40] Hung CT, Mauck RL, Wang CCB, Lima EG, Atheshiana GA. A Paradigm for Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage via Applied Physiologic Deformational Loading. *Annals of Biomed. Eng.* 2004;32(1):35-49
- [41] Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS, Lin EY, Schurmann DJ, Goodman SB, Smith RL. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *Journal of Orthopaedic research* 2003;21:110-116

- [42] Imler SM, Doshi AN, Levenston ME. Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004;12:736-744
- [43] Ingmann AM, Ghosh P, Taylor TKF. Variation of collagenous and non-collagenous proteins of human knee joint menisci with age and degeneration. *Gerontologia* 1974;20:212-223
- [44] Jackson DW, McDevitt CA, Simon TM, Arnoczky SP, Atwell EA, Silvino NJ. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in goats. *Am J Sports Med* 1992;20:644-656
- [45] King D. The healing of semilunar cartilage. *J Bone Joint Surg AM* 1936;18:333-342
- [46] Klompmaker J, Veth RP, Jansen HW, Nielsen HK, de Groot JH, Pennings AJ, Kuijjer R. Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: Characterization of the repair tissue and the role of vascularity. *Biomaterials* 1996;17(17):1685-1691
- [47] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993 260:920-926
- [48] Lanzer WL, Komenda G. Changes in Articular Cartilage After Meniscectomy. *Clin Orthop* 1990;252:41-48
- [49] LeRoux MA, Arokoski J, Vail TP, Guilak F, Hyttinen MM, Kiviranta I, Setton LA. Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. *J Orthop. Res.* 18, 383, 2000
- [50] Li KW, Williamson AK, Wang AS, Sah RL. Modulators of cartilage biology. *Clin Orthop* 2001;391S:34-48
- [51] Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage. Springer-Verlag 1998 ISBN:3-540-64350-8 S.129-130

- [52] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends in Biotechnology Vol.22 No.2 Feb 2004
- [53] Martinek SM. Der Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von humanen Fibrochondrozyten aus unterschiedlichen avaskulären Regionen des Meniskus, Dissertation, 2001, Technische Universität München
- [54] Martinek V, Usas A, Pelinkovic D, Robbins P, Fu FH, Huard J. Genetic engineering of meniscal allografts. Tissue Eng 2002;8:107-117
- [55] Mauck RL, Nicoll SB, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Synergistic Action of Growth Factors and Dynamic Loading for Articular Cartilage Tissue Engineering. Tissue Engineering 2003;9(4):597-611
- [56] McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. Clin Orthop 1990;252:8-18
- [57] Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. Arthritis Rheum 1973;16:397-405
- [58] Nägele M, Adam G. Moderne Kniegelenkdiagnostik, bildgebende Verfahren und klinische Aspekte, Springer, Berlin, 1995
- [59] Newman AP, Anderson DR, Daniels AU, Dales MC. Mechanics of the healed meniscus in a canine model. AM J Sports Med 1989;17:164-175
- [60] Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Hohammed HO. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- $\beta$ . J. Orthop. Res. 16, 531, 1998
- [61] Putz R, Pabst R, unter Mitarbeit von R. Putz, Atlas der Anatomie des Menschen / Sobotta, Band 2: Rumpf, Eingeweide untere Extremitäten, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2000, 21. Auflage, Band 2, 291

- [62] Rijk PC. Meniscal Allograft Transplantation- Part I: Background;Results, Graft Selection and Preservation, and Surgical Considerations. *Arthroscopy* Vol 20:No 7:2004:pp728-743
- [63] Rodkey W, Steadman R, Li S. A clinical study of collagen meniscus implantats to restore the injured meniscus. *Clin. Orthop.* 367S, 1999, 281– 292
- [64] Rösler H, Rütter W. *Orthopädie, Untere Extremität, Kniegelenk*, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2000, 296
- [65] Ryan L, McCarty D. Calcium pyrophosphatecrystal deposition disease; pseudogut; articular chondrocalcinosis. In: *Arthritis an Allied Conditions*, Philadelphia, Lea & Febiger, 1989, ed.11, 1721
- [66] Schiebler TH. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie; mit 21 Tabellen* von Junqueira LC, Carneiro J. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio; Springer; 4. Auflage; S.187-188
- [67] Sethi PM, Coper A, Jokl P. Technical tips in orthopaedics: meniscal repair with use of an in situ fibrin clot. *Arthroscopy* 2003 May-Jun;19(5):E44
- [68] Setton LA, Mow VC, Muller FJ, Pita JC, Howell DS. Mechanical behaviour and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 1, 1997
- [69] Setton LA, Guilak F, Hsu EW, Vail TP. Biomechanical Factors in Tissue Engineered Meniscal Repair. *Clin Orthop*, 1999;367S:254-272
- [70] Steadman JR, Rodkey WG. Tissue-Engineered Collagen Meniscus Implants: 5- to 6-Year Feasibility Study Results. *Arthroscopy*. Vol 21, No 5, 2005, 515-525

- [71] Stone K, Rodkey W, Webber R, Steadman R. Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biomechanically. *Am. J. Sports Med.* 20, 1992, 104– 111
- [72] Stone K, Steadman JR, Rodkey W. Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. *J. Bone Joint Surg.* 79, 1997, 1770– 1777
- [73] Sweigart MA, Athanasiou KA. Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng* 2001; 7(2):111-129
- [74] Takahashi K, Kubo T, Kobayashi K, Imanishi J, Takigawa M, Arai Y, Hirasawa Y. Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like line. *J Orthop Res* 1997;15:150-158
- [75] Walker PS, Erkmann MJ. The role of the menisci in force transmission across the knee; *Clin Orthop* 1975;109:184-92
- [76] Webber RJ, Harris MG, Hough AJJ. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res* 1985;3:36-42
- [77] Webber RJ, York JL, Vanderschelden JL, Hough AJJ. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med.* 1989;17:393-400
- [78] Williamson AK, Chen AC, Sah RL. Compressive properties and function-composition relationships of developing bovine articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 19, 1113, 2001
- [79] Zimny ML, Albright DL, Dabeziew E. Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat.* 1988,133:35-40
- [80] Vunjak-Novakovic G. The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors. In: *Tissue Engineering of Cartilage and Bone.* Novartis Foundation Symposium 249. Chair Caplan AI. John Wiley & Sons Ltd. 2003. 34-51

## **8. Danksagung**

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Imhoff und Herrn PD Dr. med. Martinek für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in ihrem Labor diese Arbeit durchführen zu dürfen.

Dr. med. Bräun für die ausgezeichnete Betreuung sowohl in wissenschaftlicher wie auch in menschlicher Hinsicht.

Meinen Eltern und meinem Bruder für ihren anhaltenden Rückhalt und Antrieb.

Meinen Freunden C. Dittrich und L. Niklas für ihre aufbauende Unterstützung.

## 9. Lebenslauf

Nachname:	Askevold
Vornamen:	Ingolf Harald
Geburtsdatum/-ort:	17.08.1978, Starnberg
Eltern:	Dr. med. Berta Askevold Dr. med. Harald-H. Askevold
Geschwister:	Björn Askevold
Schulbildung:	
1985- 1989	Grundschule Feldafing
1989-1998	Gymnasium Starnberg
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	
01.07.1998-31.07.1999	Malteser Hilfsdienst Starnberg
Hochschulausbildung:	
SS 1999 – WS 2005/06	Ludwig-Maximilians-Universität München: Studiengang Humanmedizin
03/2001	Ärztliche Vorprüfung
03/2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2004	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit 03/06	Wissenschaftlicher Assistent an dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, Abt. für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Kinder- und Transplantationschirurgie, Prof. Padberg