

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt,
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Knochen- und Knorpelzellwachstum im
dreidimensionalen Ko-Kultursystem**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefanie Strobl
aus Ingolstadt

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Herbert Zenker

Prof. Dr. med. vet. Mehdi Shakibaei

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Matthias Schieker
Dr. med. Michael Stengele

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Therapieoptionen bei Knochen- und Knorpeldefekten	6
1.2. Tissue Engineering von Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten	8
1.2.1. Zellen und Zellcharakterisierung	10
1.2.2. Leitschienen.....	13
1.2.2.1. Leitschienen für das Tissue Engineering von Knochen	14
1.2.2.2. Leitschienen für das Tissue Engineering von Knorpel.....	15
1.2.3. Beimpfungsmethoden	16
1.2.4. Nährmedien, Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren.....	16
1.2.5. Bioreaktoren und Kultivierung von Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten....	17
1.3. Aufgabenstellung	19
1.3.1. Etablierung eines 3D-Knochen-Knorpel-Ko-Kultivierungssystems.....	19
1.3.2. Dynamische Kultivierung von Ko-Konstrukten	20
1.3.3. Zellwachstum und Zelldifferenzierung bei dynamischer Kultivierung	20
1.3.4. Vergleich mit Folgeuntersuchungen bei optimiertem Versuchsansatz....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Zellkultivierung	21
2.1.1. Herstellung von Nährmedien und Zusätzen	21
2.1.2. Zellkulturtechniken	23
2.1.3. Ansatz von Patienten-Zellkulturen in Explant-Technik	24
2.2. Kultivierung von Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten	24
2.3. Versuchsauswertung.....	31
2.3.1. Aufbereitung der kultivierten Ko-Konstrukte.....	31
2.3.2. Histologie, Immunhistochemie und Rasterelektronenmikroskopie	32
2.4. Folgeuntersuchungen bei optimiertem Versuchsansatz.....	34
2.5. Material, Geräte und Werkzeuge	36
3. Ergebnisse	40
3.1. Makroskopische Betrachtung	40
3.2. Auflichtmikroskopische Betrachtung	40
3.3. Histologische Auswertung.....	41
3.3.1. Histologie nach Anfertigung von Kryoschnitten.....	41
3.3.2. Histologie nach Anfertigung von MMA-Einbettungen.....	42

3.4. Auswertung immunhistochemischer Markierungen	44
3.4.1. Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse	45
3.4.2. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse	48
3.5. Rasterelektronenmikroskopische Auswertung	48
3.6. Folgeuntersuchungen bei optimiertem Versuchsansatz.....	50
3.6.1. Technische Modifikationen am Bioreaktorsystem	50
3.6.2. Ortsstabilität der Ko-Konstrukt-Komponenten	50
3.6.3. Histologische Auswertung.....	51
3.6.4. Auswertung immunhistochemischer Markierungen.....	52
4. Diskussion.....	54
4.1. Diskussion von Material und Methoden	54
4.1.1. Festlegung der Beurteilungskriterien	55
4.1.2. Material und Methoden im Rahmen der Versuchsansätze	55
4.1.2.1. Zellen	58
4.1.2.2. Leitschienen.....	61
4.1.2.3. Besiedlungsmethoden	62
4.1.2.4. Bioreaktorsystem	66
4.1.3. Material und Methoden im Rahmen der Auswertung	69
4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	69
4.2.1. Makroskopische Betrachtung.....	69
4.2.2. Auflichtmikroskopische Betrachtung	70
4.2.3. Histologische Auswertung.....	70
4.2.4. Immunhistochemische Markierungen	71
4.2.5. Rasterelektronenmikroskopische Auswertung	75
4.3. Vergleich mit Folgeuntersuchungen.....	76
4.4. Zusammenfassende Beurteilung.....	77
4.4.1. Besondere Aspekte hinsichtlich des klinischen Einsatzes	77
4.4.2. Potentielle Problemstellungen.....	78
4.4.3. Einschränkungen	78
4.5. Klinische Relevanz und Ausblick.....	80
5. Zusammenfassung	81
6. Literaturverzeichnis.....	84
Anhang	96

Abkürzungsverzeichnis	98
Danksagung.....	99
Lebenslauf	100
Publikationen	102

1. Einleitung

Während der vergangenen zwei Jahrzehnte wurden viele neue Therapieansätze beschrieben, die die Behandlung von Patienten mit Organversagen oder Gewebeverlust möglicherweise revolutionieren. Dabei verspricht der sich rasch entwickelnde Forschungsbereich Tissue Engineering innovative Therapiemöglichkeiten in Form von "lebendigen Ersatzteilen". Tissue Engineering repräsentiert die Fusionierung von jüngsten Entwicklungen in der Zell- und Molekularbiologie mit den Erkenntnissen aus der Materialforschung, der Biochemie sowie der Biomechanik (Risbud et al. 2002). Die Methode des Tissue Engineering beruht dabei auf dem Prinzip, vitale Zellen außerhalb des Körpers zu kultivieren, ggf. mit extrazellulären Komponenten biologischen oder synthetischen Ursprungs zu kombinieren und die so entstehenden bioartifiziellen Konstrukte an die Stelle eines Defektes zu implantieren. Der Vorteil solcher Implantate besteht darin, dass sie vom Immunsystem des Patienten toleriert werden, und nicht wie bei allo- und xenogenen Transplantaten die Gefahr von Abstoßungsreaktionen besteht. Die Herstellung von Gewebe, das aus Knochen und Knorpel besteht, ist besonders in der Orthopädie und Unfallchirurgie hinsichtlich eines möglichen Gelenkersatzes von Interesse (Lynn et al. 2004, Schultz et al. 2000). Ein weiteres Einsatzgebiet für osteochondrale Implantate wären Rekonstruktionen im Kopf-Hals-Bereich in der HNO-, MKG- und plastischen Chirurgie (Rotter et al. 2005, Weng et al. 2001).

1.1. Therapieoptionen bei Knochen- und Knorpeldefekten

Der Bedarf an geeignetem funktionellem osteochondralen Ersatzmaterial für erworbene sowie angeborene Defekte ist sehr groß. Wie Hunter bereits 1743 bemerkte: "Cartilage once destroyed, never heals", gibt es keine physiologische Regeneration von hyalinem und elastischem Knorpel (Hunter 1743). Die Ursache dafür ist die geringe mitotische Aktivität der Chondrozyten und die Eigenschaft, dass Knorpel bradytrophes Gewebe und nicht vaskularisiert ist. Wenn Knorpeldefekte bis in das Perichondrium bzw. in den subchondralen Knochen reichen, wachsen Blutgefäße in den Defekt ein. In diesem Fall wird dieser durch minderwertiges bindegewebiges Narbengewebe ausgefüllt. Viele Therapieverfahren wurden in den vergangenen vier Jahrzehnten angewendet, doch keines war dazu in der Lage beschädigten Knorpel

langfristig durch hyalines Knorpelgewebe zu ersetzen (Suh et al. 2000). Die Therapie von Knorpelschäden ist ein häufiges Problem, besonders beim jungen und aktiven Patienten. Bei der Wahl der Behandlungsmethode müssen die Defektgröße, Alter und Gewicht des Patienten, weitere Erkrankungen wie Bänder- und Meniskusprobleme und Fehlstellungen sowie die Beanspruchung berücksichtigt werden. Der Nutzen von arthroskopischer Lavage, Shaving oder Debridement hält meist nur kurz an. Bei älteren Patienten können sich die Abrasionsarthroplastik nach Johnson oder die Bohrung nach Pridie als hilfreich erweisen. Für kleinere Defekte scheint die Microfracturing-Methode eine effektive Alternative zu sein. Den letztgenannten drei Methoden ist das Prinzip der Penetration der subchondralen Knochenschicht gemeinsam, welche über die verursachte Blutung die Einwanderung von Zellen mit chondrogenem Potential in den Defekt zum Ziel hat (Burkart et al. 2001). Eine weitere Methode ist die autologe Chondrozyten-Implantation (ACI). Hierzu werden autologe Chondrozyten amplifiziert und anschließend unter einen eingenähten, fixierenden Periostlappen in den Defekt injiziert (Brittberg et al. 1994). Die Schwierigkeit hierbei ist die Fixierung der Zellen, da der Periostlappen alleine die Zellen nicht effektiv genug fixiert. Bei kleinen und mittelgroßen fokalen chondralen und osteochondralen Läsionen in lasttragenden Gelenken scheint die autologe, osteochondrale Mosaikplastik eine vorteilhafte Behandlungsmethode zu sein. Nachteil dabei ist, dass nur Defekte in einer Größe von bis zu 4 cm² versorgt werden können, da das Spendermaterial nur begrenzt zur Verfügung steht und die Entnahme größerer Stücke eine so genannte "major donor site morbidity" nach sich zieht (Hangody et al. 2003). Für die Transplantation von ossärem oder osteochondralem Material können ebenso Allografts eingesetzt werden, welche aus Knochenbanken zu beziehen sind (Gross et al. 1985). Dabei muss das Spendermaterial bezüglich Infektiosität getestet und immunologisch kompatibel zum Empfänger sein, da es sonst zu Abstoßungsreaktionen kommt. Jedoch zeigt nur der transplantierte Knochenanteil des Allografts Einwachsverhalten in den nativen Knochen, während an der Grenze von transplantiertem Knorpel zu nativem Knorpel keine Interaktionen zu finden sind (Garrett 1993). Eine weitere Therapiemöglichkeit der unikompartimentellen Gonarthrose aufgrund eines Genu valgum oder Genu varum ist die Umstellungsosteotomie zur Entlastung der stärker beanspruchten Kondylenseite. Dieses Vorgehen bringt einigen Patienten Besserung bezüglich Schmerzen und Beweglichkeit, jedoch keine vollständige Remission. Immerhin 25 % der Patienten benötigen nach durchschnittlich fünf Jahren

trotzdem ein künstliches Gelenk (Pfahler et al. 2003). Letztendlich bleibt bei größeren Defekten der Gelenkfläche von Beginn an nur die Versorgung mit einer künstlichen Gelenkprothese. Diese gibt es als Voll-, Teil- oder Schlittenendoprothesen. Trotz der Problematik von Prothesenlockerung, Materialermüdung, Protheseninfektion und periprothetischen Osteolysen hat sich die Endoprothetik zu einem Standardverfahren entwickelt (Jones et al. 2005). In der plastischen Chirurgie wird der Bedarf an Knorpel z.B. zur Korrektur der Mikrotie mit autologem Rippenknorpel gedeckt, aus dem nach Entnahme eine Ohrmuschel geformt und anschließend unter die Ohrhaut implantiert wird (Brent 2002). Alternativ zu diesen Verfahren kann das Tissue Engineering in Zukunft vorteilhafte Therapiemöglichkeiten bieten. Treibende Kraft in diesem Forschungsbereich ist die Idee, aus bioinerten Materialien mit darin integrierten Zellen, die dem Patienten zuvor in geringer Anzahl entnommen wurden, "lebendige Ersatzteile" in der gewünschten Form und Größe *in vitro* zu generieren (Lanza et al. 2000). Vorteil dieser Methode ist die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit an Implantatmaterial bei gleichzeitig minimaler donor site morbidity. Unter Verwendung von mittels Tissue Engineering hergestellten Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten können osteochondrale Defekte therapiert werden, was bereits im Tiermodell an Kaninchen und Pferden nachgewiesen werden konnte (Schaefer et al. 2002, Hendrickson et al. 1994).

1.2. Tissue Engineering von Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten

Grundlegende Idee ist es, osteochondrale Defekte durch Implantation von mittels Tissue Engineering hergestellten osteochondralen Konstrukten zu therapieren. Die Implantation von solchen Konstrukten mit einer Gelenkknorpelschicht auf einem knöchernen Sockel bietet insbesondere den Vorteil einer einfacheren Verankerung des Implantates im Defekt (Cancedda et al. 2003). Das Tissue Engineering von Knochen erfordert wie das Herstellen von anderen Geweben und Hybridorganen auch das Zusammenspiel der drei biologischen Grundelemente: Zellen, extrazelluläre Matrix als Gerüst bzw. Leitschiene sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Bruder et al. 1999). Bevor man diese drei Grundelemente kombiniert hat, gab es Strategien, die sich jeweils auf eines der drei Elemente stützten.

Zellbasierte Verfahren

Das Prinzip der zellbasierten Verfahren gründet darauf, dass Zellen mit osteogenen Eigenschaften direkt in einen Knochendefektbereich eingebracht werden und dort die Bildung von neuem Knochen initiieren sollen. Weil dieses Verfahren nicht abhängig vom Vorhandensein von Osteoprogenitorzellen an der Defektstelle ist, ist es besonders geeignet für Defekte, bei denen das Gewebebett geschädigt ist. Für dieses Verfahren stehen grundsätzlich vier verschiedene Zellarten zur Auswahl: (1) unfraktioniertes frisches Knochenmark, (2) isolierte, in Zellkultur vermehrte humane Mesenchymale Stammzellen, (3) differenzierte Osteoblasten und Chondrozyten oder (4) Zellen, die genetisch verändert wurden und z.B. rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein (rhBMP) exprimieren (Bruder et al. 1999).

Matrixbasierte Verfahren

Die matrixbasierten Verfahren beruhen auf dem Konzept, dass Form und Funktion von Geweben wiederhergestellt werden können, allein wenn biokompatible, zum Tragen von Lasten geeignete Materialien in einen Defekt eingesetzt werden. Dazu wurden Titanfasermetalle und Keramiken aus Hydroxylapatit oder Trikalziumphosphat bzw. deren Kombination verwendet, welche eine poröse Struktur aufweisen, um das Einwachsen von Knochenzellen zu ermöglichen. Diese Eigenschaft wird als Osteokonduktivität bezeichnet. Die fehlende biologische Aktivität, insbesondere aber ebenfalls fehlende osteoinduktive Eigenschaften dieser Materialien limitieren ihre Einsatzmöglichkeiten. Zudem stellte sich heraus, dass diese Methode keine brauchbare Langzeitlösung ist, da die Materialien nicht in den Knochen integriert wurden (Boyan et al. 1999, Cornell 1999).

Proteinbasierte Verfahren

Proteinbasierte Verfahren arbeiten mit Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren wie z.B. rhBMP, die eine zum Teil ausgeprägte osteoinduktive Wirkung aufweisen. In mehreren klinischen Studien wurde Wirksamkeit und Sicherheit von rhBMP am Menschen nachgewiesen, wobei die Wirksamkeit insbesondere von der Dosierung, der Trägersubstanz sowie lokalen Bedingungen im Knochendefekt abhängt (Termaat et al. 2005).

Diese Grundprinzipien des Tissue Engineerings von Knochen lassen sich dabei auch weitgehend auf das Tissue Engineering von Knorpel übertragen. Als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren kommen beim Tissue Engineering von Knorpel so genannte Cartilage-Derived Morphogenetic Proteins (CDMPs) und Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)-Isoformen zum Einsatz (Reddi 2000). Als chondrokonduktive Leitschienen werden Agarose, Fibrinkleber, Fibrinkleber-Polymer-Kombinationen, Polymervliese, Polyglykolsäure- (PGA-) / Polylaktidsäure- (PLA-) / Polyglykol-L-Laktidsäure- (PGLA-)Schäume, Kollagen oder Hyaluronsäure verwendet. Die Leitschienen können mit Chondrozyten oder mit Zellen mit chondrogener Differenzierungspotenz wie z.B. mesenchymalen Progenitorzellen, Periost-Zellen oder Perichondrium-Zellen besiedelt werden. Nach Auswahl und Zusammenfügen von einzelnen Elementen zu einem osteochondralen Konstrukt, muss dieses *in vitro* in einem Bioreaktorsystem, das eine Perfusionskultivierung ermöglicht und darüber hinaus den Anforderungen der beiden unterschiedlichen Kompartimente gerecht wird, kultiviert und differenziert werden (Sittinger et al. 1994).

1.2.1. Zellen und Zellcharakterisierung

Grundlegende Voraussetzung für das Tissue Engineering ist die Auswahl geeigneter Zellen sowie die Generierung ausreichender Zellmengen. Im Knochenmark existieren Zellen verschiedener Differenzierungsstufen: Die osteoblastäre Differenzierungskaskade beginnt bei der multipotenten Progenitorzelle, welche sich durch den Einfluss von BMPs zur bipotenten Progenitorzelle entwickelt, aus der sich sowohl Osteoblasten als auch Chondroblasten bilden können. Durch weitere Einwirkung von BMPs sowie diversen anderen Faktoren durchläuft die Osteoprogenitorzelle die Zwischenstufe des Präosteoblasten, aus welchem der aktive Osteoblast und anschließend der ruhende Osteozyt entsteht. Die chondrogenen Zellen des Knochenmarks entwickeln sich zu Chondroblasten und beginnen innerhalb der Proliferationszone mit der Matrixsynthese. Sobald ein Chondroblast in den postmitotischen Zustand übergeht, wird er Chondrozyt genannt (Benninghoff et al. 2002). Prinzipiell stehen zum Tissue Engineering von Knochen mehrere verschiedene Zellarten zur Verfügung:

Unfraktioniertes Knochenmark

Frisches unfraktioniertes, aus dem Beckenkamm gewonnenes Knochenmark enthält osteogene Vorläuferzellen und führt nach Implantation an die Stelle eines Defektes

zu effektiver Knochenregeneration. Limitierender Faktor ist, dass meist nicht genügend unfraktioniertes Knochenmark gewonnen werden kann, um eine akzeptable Menge an Osteoprogenitorzellen zu erhalten. Diese Zellen sind bestenfalls in einem Prozentsatz von 0,001% aller kernhaltigen Zellen des Knochenmarks vertreten. Für die Überbrückung eines Defektes größerer Dimension haben sich Knochenmarkszellen darüber hinaus als ungeeignet erwiesen (Bruder et al. 1999).

Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind pluripotente Zellen im adulten Knochenmark. Sie können durch den Zusatz geeigneter Differenzierungsfaktoren in Richtung osteozytäre, chondrozytäre und adipozytäre Zellreihen differenziert werden (Pittenger et al. 1999).

Osteoblasten

Die Verwendung von vordifferenzierten Osteoblasten verbessert die Rate und das Ausmaß der Knochenregeneration. Jedoch ist es um einiges schwieriger, autologe osteoblastische Zellen zu gewinnen als hMSC, und auch nach der Isolation besitzen Osteoblasten nur eine limitierte Proliferationskapazität (Bruder et al. 1999).

Genetisch modifizierte Zellen

Indem man Zellen mit cDNA von beispielsweise rhBMP-2 transfiziert, wird durch diese genetische Modifikation eine Expression von BMP und damit eine signifikante Steigerung der Knochenneubildung erreicht (Bruder et al. 1999). Eine neuere Studie zeigte, dass die Transfektion von aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (Adipogen tissue derived stem cells(ASC)) mit dem Gen pcDNA3.1-Osx bei diesen eine osteogene Differenzierung bewirkt. Das Proliferationsvermögen wird dabei nicht beeinträchtigt. Da ASCs relativ einfach isoliert und genetisch modifiziert werden können, wird große Hoffnung in diese Zellquelle für die weitere Anwendung im Bereich des Tissue Engineering von Stützgewebe gesetzt (Wu et al. 2007).

Periost

In der Literatur finden sich auch Ansätze unter Verwendung von Periost. Dabei werden entweder aus dem Periost isolierte Zellen verwendet (Perka et al. 2000) oder frisches komplettes Periost um eine geeignete Leitschiene gelegt (Isogai et al. 1999).

Zur Herstellung von Knorpel können proliferierte Zellen aus Nasenseptumknorpel-Biopsien (Haisch et al. 1998) oder aus Gelenkknorpelbiopsien (Kaps et al. 2004) zur Anwendung kommen. Das Proliferationspotential von Nasenseptum-Chondrozyten für die *in vitro* Generierung von Knorpeltransplantaten ist sehr hoch. Proliferationsraten mit Faktor 1.000 und mehr können erzielt werden. Zwischen dem Proliferationsvermögen und dem Lebensalter des Patienten konnte kein Zusammenhang festgestellt werden (Sittinger et al. 1997). Bei einem Vergleich der Charakteristika von proliferierenden und ausdifferenzierten Zellen zeigte sich, dass Chondroblasten und Osteoblasten in 2D-Kultur schnell proliferieren, während matrixbildende Osteozyten sich nicht mehr teilen. Beim Tissue Engineering verläuft die Zellkultur in drei Phasen, wobei die Zellen zuerst im Stadium der Expansion von der Interphase in Richtung hoher mitotischer Aktivität mittels Fötalem Kälberserum (FCS) stimuliert werden sollten, um ausreichende Zellzahlen zu erlangen. Dabei beginnen die Zellen ihre spezifischen Charakteristika zu verlieren. Im zweiten Schritt erfolgt die Initiation der Differenzierung mit Morphogenen, d.h. Ziel ist die Beendigung der schnellen Zellteilung und Reifung zur osteoblastenähnlichen Zelle hin. Während des dritten Schrittes erfolgt die endgültige Differenzierung mit Synthese von histiotypischen Markern und deren Stabilisierung (Strehl et al. 2002). Die Charakterisierung von humanen Knochenzellen ist anhand verschiedener Eigenschaften möglich. Die Morphologie der Zellen gleicht der von tierischen Osteoblasten, welche mononukleär, multipolar und abgeflacht sind. Knochenzellen reagieren auf Stimulation mit Parathormon mit einer Erhöhung des cAMP-Spiegels. Osteocalcin kann nachgewiesen werden und die Osteocalcinproduktion kann durch Einwirkung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol gesteigert werden. Knochenzellen in Kultur produzieren Kollagen, welches meist ausschließlich Kollagen Typ I ist (Auf'mkolk et al. 1985). Eine weitere Charakterisierungsmethode sind immunhistochemische Methoden, mit denen native hMSC, differenzierte hMSC und humane Osteoblasten anhand von typischen Markierungsprofilen unterschieden werden können (Pautke 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus OP-Material gewonnene humane Osteoblasten und Chondrozyten verwendet, die nach standardisierten Verfahren isoliert, kultiviert, proliferiert und differenziert wurden.

1.2.2. Leitschienen

Bisherige Untersuchungen verdeutlichen, dass eine erfolgreiche Transplantatgenerierung entscheidend vom dreidimensionalen Trägermaterial abhängt (Sittinger 1997). Ohne Leitschiene ist kein dreidimensionales Knochen- oder Knorpelwachstum möglich, da Zellen dem Prinzip der Kontakthemmung folgen und sich nicht weiter teilen, sobald sie aneinander stoßen. Daher wachsen Nicht-Tumorzellen nur in Monolayerkulturen, während Tumorzellen meist unregelmäßig, auch in mehreren Layern übereinander wachsen (Lindl 2002). Die Implantation einer Leitschiene alleine ist auch ein Therapieansatz, aber die Vorbesiedelung der Leitschienen *in vitro* mit Zellen liefert gegenüber der Verwendung unbesiedelten Knochenersatzes signifikant bessere Ergebnisse (Ohgushi et al. 1993). Die ideale Matrix für das Tissue Engineering von Knochen und Knorpel sollte folgende Anforderungen erfüllen (Schieker et al. 2006, Hutmacher 2000):

- Ausreichende Retention und Immobilisierung der Zellen für eine gleichmäßige Besiedelung *in vitro*
- Unterstützung rascher Neovaskularisation
- Formbarkeit in anatomisch relevante Formen
- Biokompatibilität
- Biodegradierbarkeit und Resorbierbarkeit
- Strahlentransparenz zur besseren Unterscheidung von originärem Knochen und neu hinzugefügten Konstrukten
- Osteokonduktivität bzw. Chondrokonduktivität
- Belastungsstabilität
- Einfaches Handling in der Praxis
- Interkonnektivität der Poren und geeignete Dimensionierung der Poren

Dabei sind der Grad der Interkonnektivität sowie die Makroporosität besonders bedeutsam. Das Ausmaß der Zellmigration und die Verteilung der Zellen in der gesamten Leitschiene sind von interkonnektierenden Poren abhängig. Zudem ermöglichen interkonnektierende Poren die bedarfsgerechte Versorgung mit Nährmedium auch im Zentrum der Leitschiene. Die Makroporosität muss mit der Zellgröße korrelieren, damit eine Zelleinwanderung überhaupt möglich ist. Im Falle der humanen Osteoblasten beträgt der ideale Porendurchmesser 600 μm (Frosch et al. 2002). Leit-

schienen sollten zudem frei verfügbar, lagerbar, einfach sterilisierbar, kostengünstig herstellbar, nicht toxisch und nicht kanzerogen sein, sowie keine oder nur passagere Antigenität besitzen.

1.2.2.1. Leitschienen für das Tissue Engineering von Knochen

Viele biologische und synthetische Materialien wurden in den vergangenen Jahren als Trägermaterialien für das Tissue Engineering von Knochen erprobt. Bei einem Vergleich von 16 verschiedenen Biomaterialien aus fünf Gruppen, zeigten die vier folgenden eine sehr gute Zelldichte und Proliferationsrate. (1) Tissue Vlies[®], eine bovine Kollagenmembran, (2) Biomend[™], eine bovine Kollagen Typ I-Membran aus der Achillessehne, (3) Sepra-Film, eine chemisch modifizierte Natrium-Hyaluronsäure- und Carboxymethylzellulose-Membran und (4) Biobrane[®], eine ultradünne, semipermeable Silikonmembran verstärkt mit Nylonfäden (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2005). In einer Studie mit humanen, osteoblasten-ähnlichen Zellen auf stark porösen, natürlichen Knochenmineralien konnten gute Ergebnisse hinsichtlich der Biokompatibilität erzielt werden (Acil et al. 2000). Doch auch synthetisch hergestellte Leitschienen wie z.B. injizierbares, aus zwei Komponenten bestehendes Polyurethan mit hydrophiler Oberfläche bieten den Zellen gute Bedingungen bezüglich Anhaftung, Proliferation und Matrixproduktion (Bonzani et al. 2007). Eine andere Variante der Oberflächenarchitektur bieten Leitschienen mit einer faserigen Oberfläche, wobei sich die Größe dieser Fasern im Nanometerbereich bewegt. Hiermit soll die natürliche Oberflächenbeschaffenheit von Kollagen-I-Fasern nachempfunden werden. Auf derartigen Nano-Faser-Leitschienen konnten höhere Mengen an Integrinen und osteoblastären Markern nachgewiesen werden als auf glattwandigen Leitschienen (Woo et al. 2007). Bei einer Untersuchung des Wachstumsverhaltens von humanen Osteoblasten auf lösungsmittelkonservierter, γ -strahlensterilisierter Spongiosa (Solvent dehydrated cancellous bone (SDCB)) wurden allogene und xenogene Leitschienen verglichen. Die Osteoblasten wachsen auf beiden Leitschienen gleich gut, der Nachweis von Osteocalcin war auf der xenogenen Matrix sogar höher (Trentz et al. 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lösungsmittelkonservierte und γ -strahlen-sterilisierte, bovine Spongiosa (Tutobone[®]) als knöcherne Leitschiene verwendet, da sie viele entscheidende Vorteile bietet. Tutobone[®] wird bereits seit 30 Jahren zur Füllung von Knochendefekten eingesetzt, da es infolge guter osteokonduktiver Eigenschaften

zum Einwachsen von Zellen und Gefäßen führt (Spector 1994). Den in 1.2.2 gestellten Anforderungen für Leitschienen entspricht Tutobone[®] insbesondere bezüglich der Interkonnektivität und der Makroporosität. Beide Leitschienen, Fibrinkleber und Tutobone[®], sind bereits für die klinische Anwendung zugelassen.

1.2.2.2. Leitschienen für das Tissue Engineering von Knorpel

Für das Tissue Engineering von Knorpel werden Gele wie z.B. Kollagen, Hyaluronsäure, Agarose und Fibrin oder Netze, Vliese und poröse Strukturen aus Poly-L-Milchsäure oder Polyglykolsäure eingesetzt. Gele erlauben eine gute Zellverteilung, sind jedoch mit Nachteilen im Bereich der mechanischen Eigenschaften behaftet. Solide Faserstrukturen erzielen eine wesentlich höhere initiale mechanische Festigkeit, sind jedoch schwieriger zu besiedeln. Daher gibt es Verfahren, in denen beide Materialien und somit deren Eigenschaften kombiniert werden können. Dabei wird stets versucht, die Menge verwendeter Biomaterialien so gering wie möglich zu halten, um unerwünschte Nebeneffekte bedingt beispielsweise durch Degradation zu vermindern. Es wäre sinnvoll, Materialien zur Herstellung von Leitschienen zu verwenden, die für die klinische Anwendung am Menschen bereits zugelassen sind. Fibrinkleber ist seit vielen Jahren im klinischen Alltag im Rahmen unterschiedlichster Indikationen in Gebrauch. Problematisch bei Fibrintransplantaten sind Gewebeschrumpfungen und vorzeitige Degradation (Sittinger 1997, Homminga et al. 1993). In einer Studie am Ziegenmodell wurden xenogene, isolierte und in Fibrinkleber suspendierte Chondrozyten verwendet, welche auf einem unbesiedelten Hydroxylapatit-Sockel in Kniegelenke implantiert wurden. Es stellte sich heraus, dass die Chondrozyten im Fibrinkleber zwar über Wochen hinweg Matrix produzierten, der Fibrinkleber aber über Monate hinweg nicht stabil genug war, verschwand und durch fibrocartilaginöses Gewebe ersetzt wurde. Darüber hinaus lockerte sich der Hydroxylapatit-Sockel aufgrund des Verzichtes auf Fixation und einer zu schnellen Resorption (van Susante et al. 1998). Aufgrund der Tatsache jedoch, dass Fibrinkleber im klinischen Alltag schon gut eingeführt ist, wurde dieses Material als Chondrozyten-Leitschiene für die vorliegende Arbeit gewählt.

1.2.3. Beimpfungsmethoden

Die Leitschienen müssen effizient mit den in zweidimensionaler Kultur expandierten Zellen besiedelt werden. Eine Schwierigkeit hierbei ist die gleichmäßige Zellverteilung, welche mit darüber entscheidet, ob das Ersatzmaterial im Empfängerorganismus integriert wird oder nicht. Hierzu wurde in einer Untersuchung eine statische mit einer dynamischen Besiedlungsstrategie von Endothelzellen auf einem Polyglykolid verglichen. Dabei wurden in der Gruppe der dynamischen Besiedelung die Leitschienen gleich nach der Beimpfung mit $2,7 \times 10^6$ Zellen 24 Stunden lang in eine spezielle Rührflasche gelegt, in der die Präparate ruhig liegen und nur das Medium über den Objekten durch einen Rührstab kontinuierlich mit 14 rpm gerührt wird. Es zeigte sich, dass die dynamische Besiedelung gefolgt von einer Kultivierung in einem Perfusionssystem die besten Ergebnisse erzielte (Burg et al. 2000). Im Rahmen einer anderen Arbeit wurde der Besiedlungsprozess hinsichtlich Zellkonzentration und Adhärenzzeit optimiert. Eine initiale Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml und eine Adhärenzphase von 2 h auf boviner Kollagenmembran ergab die höchsten Proliferationsraten (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2002). Die Besiedelung des Fibrinklebers wird durch das Untermischen von hochkonzentrierter Zellsuspension in eine der beiden Komponenten realisiert. Dabei können die Zellen lediglich in die Thrombin-Komponente (Homminga et al. 1993) oder auch zusätzlich in die Fibrinogen-Komponente eingemischt werden, wie es in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Im Rahmen der Besiedelung der knöchernen Leitschiene wurde nach dem in einer vorhergehenden Arbeit entwickelten Protokoll vorgegangen, wonach innerhalb einer statischen Adhärenzphase von 2 h die konzentrierte Zellsuspension im 20 Min.-Abstand regelmäßig vom Rand aufgenommen und von oben erneut auf die Leitschiene aufpipettiert wurde (Stengele 2004).

1.2.4. Nährmedien, Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren

Das Nährmedium regt durch seine besondere Zusammensetzung unter anderem die Proliferation von Zellen an. Es ist darauf ausgerichtet permanent Teilungszyklen zu initiieren. Dem konventionellen, chemisch definierten Zellkulturmedium, wie z.B. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wird dazu Fetales Bovines Serum (FBS) hinzugefügt, welches als Naturprodukt eine chemisch nicht definierte Menge an Wachstumsfaktoren, Hormonen, Anheftungsfaktoren, Aminosäuren und Immunglo-

buline enthält (Lindl 2002). Nachdem die Zellen auf eine Leitschiene aufgetragen wurden, können die Zellen mit verschiedenen Agenzien in Richtung der gewünschten Zelllinie differenziert werden. Eine chondrogene Differenzierung von hMSC ist z.B. unter Zusatz von TGF- β (Pittenger et al. 1999), eine osteogene Differenzierung z.B. unter Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat initiiert (Jaiswal et al. 1997). Die Zusätze führen zur Induktion oder zu einer vermehrten Expression von zelltypischen Matrixprodukten. Unter den verschiedenen Wachstumsfaktoren spielt das Bone Morphogenetic Protein (BMP), welches zur TGF- β -Familie gehört, eine wichtige Rolle in der Differenzierung der hMSC. BMP-2 bewegt undifferenzierte mesenchymale Progenitorzellen dazu sich zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren. BMP-2 stimuliert auch die festgelegten Osteo-Chondro-Progenitorzellen, sich in reifere Zelltypen weiterzuentwickeln (Yamaguchi 1995). Die *in vitro* Stimulation von Osteoblasten auf Trägermaterialien wie Bio-Oss[®] oder Tutoplast[®] mit rekombinantem humanem BMP-7 (auch Osteogenic Protein-1 (OP-1)) mit anschließender Implantation der Konstrukte führt zu einer besseren Osseointegration der Biomaterialien *in vivo* (Acil et al. 2002). Darüber hinaus sind eine ganze Reihe weiterer Wachstumsfaktoren im Knochen enthalten, wie z. B. Insulin-like Growth Factor I und II (IGF-I, IGF-II), TGF- β_1 und TGF- β_2 , Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und BMPs. Sie werden von Osteoblasten produziert und haben sowohl autokrine als auch parakrine Funktion (Baylink et al. 1993). Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der Erforschung der osteogenen Wachstumsfaktoren beträchtliche Fortschritte erzielt wurden, während im Bereich der chondrogenen Wachstumsfaktoren kaum eine Weiterentwicklung zu verzeichnen war (Wozney et al. 2004). Neuere Studien deuten jedoch daraufhin, dass sowohl Ultraschallwellen als auch Druckbelastungen auf MSC eine in Richtung Chondrogenese stimulierende Wirkung haben, auch ohne den Einsatz von TGF- β (Park et al. 2006, Cui et al. 2006).

1.2.5. Bioreaktoren und Kultivierung von Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten

Im Vergleich zu Monolayerkulturen erfordern dreidimensionale Zellkulturen wesentlich höhere Zelldichten. Bei der Generierung gewebeähnlicher Strukturen werden Zelldichten angestrebt, die mit der Situation in menschlichem Gewebe vergleichbar sind. Bei solchen Zellkonzentrationen sollte das Medium zweimal täglich gewechselt werden. Andernfalls unterliegen die Zellen Schwankungen der lokalen Bedingungen

wie z.B. Schwankungen im pH-Wert, in Elektrolyt-, Laktat- oder Glucosekonzentration. Ein Bioreaktor, der nach dem Prinzip konstruiert ist, dass Zellwachstum, Versorgung mit Nährstoffen und Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten gleichzeitig vonstatten gehen, kann ein sehr stabiles Umfeld für die Zellen schaffen, das *in vivo* Bedingungen wesentlich besser simuliert als konventionelle Zellkulturen (Dhurjati et al. 2006). Auf dem Markt gibt es verschiedene Bioreaktoren mit wiederum sehr unterschiedlichen Bauweisen. Nicht alle Modelle eignen sich dazu, einem Ko-Konstrukt gleichzeitig zwei verschiedene Medien zuzuführen. Damit waren beispielsweise Spinner Flasks und Rotationsbioreaktoren, die auf dem Prinzip der Konvektion und Diffusion beruhen, in dieser Arbeit nicht anwendbar.

Spinner Flasks

Spinner Flasks sind dynamisierte Kulturbedälter und haben ein sehr einfaches Design. Mit Zellen besiedelte Leitschienen sind mit Nadeln am Verschluss der Flasche fixiert und hängen nach unten in das Medium. Die Flasche steht auf einem Magnetrührer. Durch einen Magnetrührfisch wird das Medium kontinuierlich bewegt.

Rotating wall vessels (Rotationsbioreaktoren)

Rotationsbioreaktoren sind horizontale, komplett mit Medium befüllte Zylinder mit einem semipermeablen Schlauch in der Mitte, über den das System mit Sauerstoff versorgt wird. Die Konstrukte schwimmen frei im Medium. Der Zylinder rotiert um seine Achse, somit werden die Objekte ein Stück nach oben hin mittransportiert, bis sie durch die Schwerkraft nach unten fallen. Dadurch ergibt sich eine Konvektion (Sikavitsas et al. 2002).

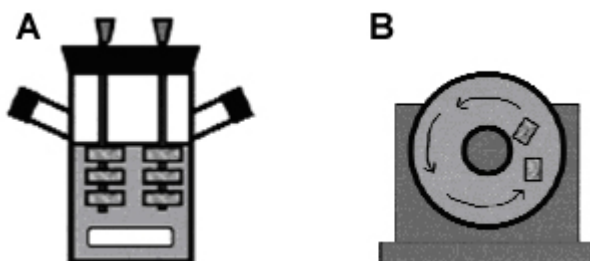


Abb. 1 A) Spinner Flask, weiss: Magnetrührfisch, darüber im Medium hängend die Objekte; B) Rotating wall vessel, Querschnitt durch den zylinderförmigen Bioreaktor, kleine Quader: Objekte im Medium frei schwimmend (Bildquelle: Sikavitsas et al. 2002).

Perfusionskultur im Bioreaktor

Zur Vermeidung von Milieuschwankungen ist ein Perfusionssystem geeignet, das eine kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen und den kontinuierlichen Abtransport von Stoffwechselmetaboliten gewährleistet und dabei die Parameter Sauerstoff, Glucose, Laktat und pH-Wert konstant hält. Ein von Minuth et al. entwickelter Bioreaktor ermöglicht eine 3D-Kultivierung, bei der sich Perfusionszellkulturen unter organotypischen Bedingungen *in vitro* differenzieren lassen. Das Nährmedium kann die Kammer während mehrerer Wochen langer Kultivierung und Differenzierung mit dem zu kultivierenden Konstrukt perfundieren. Die Kammer ist so angelegt, dass der Innenraum an der apikalen und an der basalen Seite von zwei verschiedenen Medien durchströmt werden kann. Dadurch können Gewebe generiert werden, welche eine Polarität besitzen und sich gewöhnlich in Monolayerform ausbilden wie z.B. Nierenepithel. Die Zellen werden dazu zwischen zwei Membranen in einen Haltering eingebracht und horizontal in die Kammer eingelegt. So kann an der Oberseite des Konstruktes ein anders zusammengesetztes Medium als an der Unterseite vorbeiströmen. Diese Medien unterscheiden sich z.B. im Ionenmilieu, so dass die Epithelzellen ihre Polarität beibehalten. Das Medium wird über eine Peristaltikpumpe durch den Bioreaktor gefördert. Indem die Perfusionskammer auf eine Wärmeplatte platziert wird, kann eine Temperatur von konstant 37° C aufrecht erhalten werden (Minuth et al. 2000). Siehe Abb. 5 und 6, Kapitel 2.2. In der vorliegenden Arbeit wurde der Bioreaktor dazu verwendet, die Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukte im unteren Teil mit osteogenem Differenzierungsmedium zu perfundieren und im oberen Teil, im Bereich der Knorpelkappe mit Medium, das Aprotinin enthielt, welches die vorzeitige Auflösung des Fibrinklebers verhinderte.

1.3. Aufgabenstellung

1.3.1. Etablierung eines 3D-Knochen-Knorpel-Ko-Kultivierungssystems

Ziel dieser Untersuchung war die Etablierung eines Bioreaktors zur 3D-Kultivierung von Ko-Konstrukten mit humanen Osteoblasten und Chondrozyten unter räumlich getrennter Mediumperfusion. Aus OP-Material wurde mittels Explantkultur Zellmaterial gewonnen und in 2D-Kultur proliferiert. Klinisch bereits zur Knochendefektfüllung zugelassene knöchernen Leitschienen (Tutobone®) wurden mit humanen Oste-

oblasten besiedelt. Darauf wurden in Fibrinkleber eingebrachte humane Chondrozyten als Deckschicht aufgetragen.

1.3.2. Dynamische Kultivierung von Ko-Konstrukten

Die Ko-Konstrukte wurden über zwei Wochen unter kontinuierlichem Mediumfluss in einem Bioreaktor (Gradient Container, Fa. Minucells and Minutissue, Bad Abbach, D) kultiviert. Dabei wurde das Objekt in der Perfusionskammer gleichzeitig mit zwei verschiedenen Medien versorgt. Das Knochen-Medium enthielt einen osteogenen Differenzierungszusatz, das Knorpel-Medium Trasylol, einen Fibrinolyseinhibitor.

1.3.3. Zellwachstum und Zelldifferenzierung bei dynamischer Kultivierung

Nach der Kultivierungsphase wurden die Konstrukte makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch und rasterelektronenmikroskopisch bezüglich Fibrinkleberstabilität, Zellvitalität, Wachstumsverhalten und Matrixproduktion analysiert.

1.3.4. Vergleich mit Folgeuntersuchungen bei optimiertem Versuchsansatz

In mehreren Folgeuntersuchungen wurden aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zunächst technische Verbesserungen im Bereich des Bioreaktorsystems durchgeführt. Gemeinsam mit Modifikationen im Rahmen des Versuchsansatzes sollte zum einen die Ortsstabilität der Zellen innerhalb der Knochenleitschiene sowie der Knorpelleitschiene insgesamt verbessert werden, wie auch die zielgerichtete Zelldifferenzierung innerhalb der beiden Leitschienenkompartimente. Langzeitkultivierungen über bis zu 6 Wochen sollten neben der Durchführbarkeit deutlich längerer Versuchszeiträume die Effektivität der technischen Verbesserungen belegen. Die Ergebnisse aus den Folgeuntersuchungen wurden dazu mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit verglichen.

2. Material und Methoden

Es wurden insgesamt acht dynamische Knochen-Knorpel-Ko-Kultur-Ansätze über jeweils zwei Wochen durchgeführt. Verwendet wurden Patienten-Osteoblasten und – Chondrozyten als zelluläre Komponenten, Tutobone[®] und Fibrinkleber als Leitschienen und Bioreaktoren vom Typ "Gradient Container" (Fa. Minucells and Minutissue, Bad Abbach, D). Zur osteogenen Differenzierung wurde dem Knochenmedium Osteogenic Supplement zugesetzt, zur Stabilisierung des Fibrinklebers dem Knorpelmedium ein Fibrinolyseinhibitor. Die Verwendung von Patientenmaterial wurde von der lokalen Ethikkommission überprüft und von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Während des Etablierungsprozesses waren die acht Ansätze einem kontinuierlichen problemorientierten Modifikationsprozess unterworfen. Die Untersuchungen wurden im Chirurgischen Forschungslabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München durchgeführt. Die histologische, immunhistochemische und rasterelektronenmikroskopische Auswertung erfolgte in der Anatomischen Anstalt - Lehrstuhl Anatomie I.

2.1. Zellkultivierung

2.1.1. Herstellung von Nährmedien und Zusätzen

Herstellen von Nährmedien

In dieser Arbeit kamen phasenabhängig unterschiedliche Medienzusammensetzungen zum Einsatz. Während der Proliferationsphase in der 2D-Kultur unter 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank wurde für beide Zellarten die gleiche Grundzusammensetzung (siehe Tab. 1) verwendet, zur 3D-Kultur unter Raumluft wurde DMEM mit 25 mM HEPES-Puffer zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes eingesetzt. Um in der 3D-Kultur eine Differenzierung in Richtung osteoblastäre Zellen zu initiieren wurde dem Medium so genanntes Osteogenic Supplement hinzugefügt (siehe Tab. 2). Die vorzeitige Auflösung des Fibrinklebers, der Leitschiene für die Patienten-Chondrozyten (PCH), wurde durch Zugabe des Fibrinolyseinhibitors Aprotinin (500 KIE/ml) verhindert. Während der Proliferationsphase wurde für einen Ansatz von 500 ml folgende Medienformulierung verwendet:

Inhaltsstoffe	Konzentration im Medium	Volumina für 500 ml
DMEM (low Glucose)		438 ml
FBS hitzeinaktiviert	10 %	50 ml
L-Glutamin	4 mM	10 ml (200 mM)
Penicillin-Streptomycin	40 IU/ml + 40 µg/ml	2 ml (10.000 IU/ml + 10 mg/ml)

Tab. 1 Grundzusammensetzung des Mediums während der Proliferationsphase

Herstellen und Aliquotieren von Osteogenic Supplement

Zur osteogenen Differenzierung der Patienten-Osteoblasten (POB) wurde dem Knochenmedium Osteogenic Supplement zugesetzt. Osteogenic Supplement besteht aus β -Glycerophosphat, Ascorbinsäure-2-Phosphat und Dexamethason. Gerade Dexamethason musste in sehr niedriger Konzentration (100 nM) verwendet werden. Da die Menge Dexamethason für eine 500 ml-Flasche Medium technisch nicht abwiegbare war, wurde die 100-fache Menge eingewogen, anschließend in 100 ml Aqua dest. gelöst und in 100 x 1 ml aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Dexamethason-Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und gelagert. β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat wurde jeweils in 20-fache Stoffmenge eingewogen, beides zusammen mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt und anschließend auf 20 Aliquots aufgeteilt. Alle drei Substanzen wurden vor Verwendung sterilfiltriert.

Wachstumsfaktor	Konzentration im Medium	Pulvermenge für 500 ml	Pulvermenge für 10.000 ml
β -Glycerophosphat	10 mM	1,53 g	30,6 g
L-Ascorbinsäure-2-Phosph.	0,05 mM	0,00911 g	0,1822 g
Dexamethason	100 nM	0,0003019 g	0,006038 g

Tab. 2 Wachstumsfaktoren, Konzentrationen und Stoffmengen

Inaktivieren und Aliquotieren von FBS

Das bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte fetale bovine Serum (FBS) wurde zunächst bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und anschließend bei $+56\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Min. im Wasserbad hitzeinaktiviert. Nach der Inaktivierung wurde das Serum in Portionen zu 50 ml aliquotiert und bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und gelagert.

2.1.2. Zellkulturtechniken

Passagieren von Zellen

Sobald die am Boden des Zellkulturgefäßes adhären Zellen soweit proliferiert sind, dass sie einen dichten Monolayer bilden, wird der Zellrasen als konfluent bezeichnet und muss passagiert werden. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und damit Schwebstoffe wie z.B. avitale Zellen entfernt. Zur Entfernung von Mediumresten wurde mehrmals mit PBS gespült. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen mittels einfach konzentrierter Trypsin- / EDTA-Lösung in PBS vom Flaschenboden abgelöst. Nach einer Einwirkzeit von ca. 6 - 8 Min. rundeten sich die Zellen ab, lösten sich vom Flaschenboden und gingen frei in der Enzymlösung in Suspension. Unmittelbar daraufhin wurde die Enzymwirkung des Trypsins und damit der Ablösevorgang jeweils durch Zugabe serumhaltigen Mediums gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgenommen und nach Ermittlung der Zellzahl abzentrifugiert, um Reste der Trypsin-/ EDTA-Lösung zu entfernen. Nach Resuspension in frischem Proliferationsmedium (siehe Tab. 1) wurden die Zellen in verdünnter Zellkonzentration in neue Kulturbehältnisse ausgesät. Die POB und PCH der Primärzelllinie wurden nach folgenden Richtgrößen angesetzt:

Kulturbehältnis	Fläche	Zellzahl	Mediumzugabe	Trypsinmenge (1x)
Zellkulturflasche	25 cm ²	0,5 x 10 ⁶	5 ml	1 ml
Zellkulturflasche	75 cm ²	1 x 10 ⁶	15 ml	ca. 2 - 3 ml

Tab. 3 Zellzahlen, Medium- und Trypsinmenge beim Passagieren von Zellen

Zellzahlbestimmung nach Trypanblaufärbung

Während des Passagierens von Zellen und zu Beginn der Versuchsansätze wurde die Zellzahl in einer Zellsuspension mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt. Da Trypanblau aufgrund seiner Eigenschaft als hochmolekularer, nicht membrangängiger Farbstoff nur avitale Zellen dunkel anfärbt, konnten unter mikroskopischer Betrachtung die hellen Zellen als vital identifiziert werden. Es folgte die Auszählung der vitalen Zellen in vier Quadranten des Gitternetzes und die Berechnung der Zellzahl nach folgender Formel:

Zellen in 4 Quadranten x 2,5 x 2 (=Verdünnungsfaktor) x 1.000 = Zellen pro ml

Reinigung und Sterilisation

Zur Vermeidung von Kontaminationen sind saubere bzw. sterile Bedingungen im Rahmen der Laborarbeit und insbesondere in der Zell- und Gewebekultur grundlegende Voraussetzung. Folgende Reinigungs- und Sterilisationsprozeduren wurden durchgeführt: 70 % Ethanol-Wischdesinfektion: Vor Beginn der Arbeiten wurden alle benötigten Arbeitsflächen, die Sterilbank, alle erforderlichen Geräte und Labor-Hilfsmittel gründlich mit 70 % Ethanol in Aqua dest. abgewischt. Autoklav: Hitzeunempfindliche Materialien wurden im Autoklaven 20 Min. lang bei feuchter Hitze (+ 105 °C) und Überdruck (+ 0,3 bar) autoklaviert. Wärmeschrank: Feuchtigkeitsempfindliche Materialien wurden mit trockener Heißluft 4 h bei + 200 °C sterilisiert statt autoklaviert. Sterilfiltration: Unter Verwendung von Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,2 µm wurden hitzeempfindliche, flüssige Substanzen sterilfiltriert.

2.1.3. Ansatz von Patienten-Zellkulturen in Explant-Technik

Eine grundlegende Methode war die Gewinnung von Patientenzellen zur Generierung von primären Zellkulturen. Das Spendermaterial, einerseits Teile von Fußskelettknochen, sowie andererseits Teile der Lamina perpendicularis des Nasenseptums, wurde innerhalb von 24 Stunden nach Gewinnung unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Das Spendermaterial wurde mittels Skalpell in 1 - 3 mm kleine Stücke zerteilt, in Zellkulturflaschen eingebracht und mit Proliferationsmedium bedeckt. Nach mehrtägiger Kultivierung sind Zellen aus dem Spendermaterial radiär ausgewandert, welche am Flaschenboden adhärten und proliferierten. Am 6. Tag nach Ansatz erfolgte der erste Mediumwechsel, anschließend an jedem 3. Tag. Der Zeitpunkt des Passagierens war von der Zelldichte abhängig und erfolgte bei Patienten-Osteoblasten (POB) nach 7 - 14 Tagen, bei Patienten-Chondrozyten (PCH) nach durchschnittlich 7 Tagen. Noch vor oder sofort nach der ersten Passage wurden die Primärkulturen einmalig mittels PCR mycoplasmengetestet und danach regelmäßig mikroskopisch auf Bakterien- oder Pilzinfektionen überprüft.

2.2. Kultivierung von Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in vier aufeinander folgende Schritte: (1) Zuerst wurde OP-Material im Rahmen einer Explantkultur aufbereitet und somit das Zellmaterial gewonnen. (2) Anschließend wurden die Zellen einer Proliferationsphase in

zweidimensionaler Kultur unterzogen. (3) Nachdem genügend Zellen zur Verfügung standen, wurden die Zellen auf Leitschienen angesiedelt und für 2 Wochen im Bioreaktor kultiviert und differenziert. (4) Zuletzt erfolgte die Auswertung. Wesentlicher Teil der Arbeit war die Herstellung des Knochen-Knorpel-Ko-Konstruktes. Dazu wurden knöcherne Leitschienen mit humanen Osteoblasten besiedelt. Humane Chondrozyten wurden in Fibrinkleber suspendiert und auf je eine knöcherne Leitschiene als "Knorpelkappe" aufgetragen. Diese Ko-Kultur-Konstrukte (n = 8) wurden über zwei Wochen unter kontinuierlichem Mediumfluss in Perfusionskammern kultiviert. Von acht Versuchsdurchläufen wurden drei unter exakt gleichen Bedingungen durchgeführt (KoK IV, VII, VIII). Die Unterschiede zu den übrigen Ansätzen (wie unten stehender Tabelle zu entnehmen) sind im Ergebnisteil dargestellt bzw. im Rahmen der Diskussion erörtert. Zur osteogenen Stimulation wurden dem Knochen-Medium Dexamethason (100 nM), Ascorbinsäure-2-Phosphat (0,05 mM) und β -Glycerophosphat (10 mM) zugesetzt. Das Knorpel-Medium enthielt Trasyol[®] (500 KIE/ml) zur Fibrinolyseinhibition. Nach der Kultivierungsphase erfolgte die Entnahme der Konstrukte und Fixierung in Methanol bzw. Glutaraldehyd. Anschließend wurden die Präparate in Methylmetacrylat eingebettet, bzw. entkalkt, gefriereschnitten, histologisch gefärbt, immunhistochemisch markiert und sowohl licht- als auch rasterelektronenmikroskopisch analysiert.

Folgende Versuchsansätze wurden durchgeführt:

	KoK I	KoK II	KoK III	KoK IV	KoK V	KoK VI	KoK VII	KoK VIII
POB	22 5.P	25 2.P	30 2.P	30 2.P	30 3.P	30 3.P	25 5.P	25 5.P
POB-Zahl	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
PCH	gepoolt	27 3.P	28 4.P	28 4.P	27 6.P	27 6.P	28 8.P	28 8.P
PCH/ml	undef.	$2,5 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$
FK	lyoph.	lyoph.	lyoph.	lyoph.	Fertig	Fertig	lyoph.	lyoph.
Zeit (w)	2	1	2	2	2	2	2	2
Aufbau	Sog, BS	Druck, WP	Druck, WP	AS, WP	AS, WP	AS, WP	AS, WP	AS, WP

Tab. 4 Übersicht (KoK = Ko-Kultur, POB = Patienten-Osteoblasten, PCH = Patienten-Chondrozyten, FK = Fibrinkleber, P = Passage, undef. = undefiniert, lyoph. = lyophilisiert, Fertig = Fertigteile, w = Wochen, BS = Brutschrank, WP = Wärmeplatte, AS = Allschlauchantrieb)

Zellen

Das osteoblastäre Zellmaterial (POB) stammte aus der unfallchirurgischen Abteilung der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität Mün-

chen, das chondroblastäre Zellmaterial (PCH) wurde bei Nasenseptumplastiken in der HNO-Klinik im Klinikum Großhadern gewonnen.

Laborinterne Bezeichnung	Alter	M/W	Entnahmestelle	Diagnose
POB 22	58	M	Dist. Tibia, Kalkaneus	Charcot-Arthropathie
POB 25	60	M	Os cuneiforme	Charcot-Arthropathie
POB 30	75	W	Vorfuß	Chronische Fußulcera
PCH 27	38	W	Nasenseptum	Nasenseptumdeviation
PCH 28	32	M	Nasenseptum	Nasenseptumdeviation

Tab. 5 Herkunft der Patientenzellen (M = männlich, W = weiblich)

Leitschienen

Leitschiene für POB: Bovine Spongiosa

Tutobone[®] wird aus der Spongiosa von Rinderknochen gewonnen und mittels des Tutoplast[®]-Verfahrens aufbereitet. Dazu werden die Spendertiere unter Einhaltung strenger Richtlinien ausgewählt, um das Risiko der Übertragung von infektiösen Erkrankungen zu minimieren. Desweiteren wird das Material im Ultraschallbad entfettet. Mit Hilfe osmotischer Behandlung, Oxydation und Lösungsmitteltrocknung werden Zellen, Bakterien, Viren und Prionen entfernt und die Antigenität eliminiert. Die Sterilität nach Verpackung wird durch eine Gamma-Strahlen-Sterilisation erreicht. Dadurch, dass bei diesem Aufbereitungsprozess nicht mit Hitze gearbeitet wird, bleibt die Spongiosa sehr belastungsstabil. Im Vergleich zu künstlich hergestellten Leitschienen kommt Tutobone[®] der Architektur des natürlichen Knochens am nächsten. Aus den Platten (25 x 15 x 3 mm) wurden mit Hilfe von sterilem Meißel und Locheisen runde Plättchen (∅ 9 mm, Höhe 3 mm, Volumen ca. 190 µl) ausgestanzt, so dass der Abstand zwischen Tutobone[®] und der Wandung der Kulturkammer innerhalb des Bioreaktors über den gesamten Umfang ca. 0,5 mm betrug.

Leitschiene für PCH: Fibrinkleber

Tissucol[™] ist ein für den klinischen Gebrauch zugelassener biologischer Zweikomponenten-Gewebekleber mit antihämorrhagischen Eigenschaften, der aus Humanplasma hergestellt wird. Für die Herstellung werden ausschließlich Plasmen gesunder, HBV-, HCV- und HIV-negativer Spender verwendet. Eine Komponente enthält Fibrinogen, Plasmafibrinectin und Blutgerinnungsfaktor XIII gelöst in Aprotininlösung. Aprotinin, ein Fibrinolyseinhibitor, verhindert die Proteolyse durch Proteasen.

Die zweite Komponente besteht aus Thrombin gelöst in Calciumchloridlösung. Sobald die beiden Komponenten mit Hilfe eines speziellen Applikationssystems (Duploject) miteinander in Kontakt kommen, beginnt die Gerinnungsreaktion. Die Geschwindigkeit der Verfestigung ist abhängig von der Thrombinkonzentration. Sie beträgt bei Thrombin L (4 I.E. Thrombin/ml) ca. 1 Min. ab Beginn der Vereinigung beider Komponenten, bei Thrombin S (500 I.E./ml) nur wenige Sekunden. In der vorliegenden Arbeit wurde aus Gründen besserer Handhabung eine Konzentration von 50 I.E./ml gewählt. In sechs der acht Versuchsansätze wurde Tissucol™-Kit eingesetzt, bei zwei Versuchsansätzen Tissucol™-Fertigkleber.

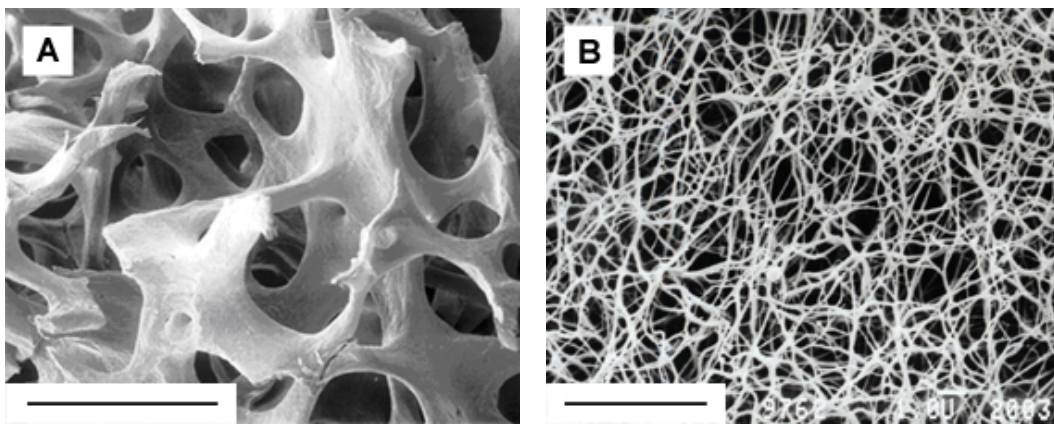


Abb. 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Leitschienenstrukturen; A) Tutobone® (Fa. Tutogen Medical, Neunkirchen am Brand, D), Maßstabsbalken 1.000 µm, Bildquelle: Tutogen Medical; B) Fibrinkleber (Tissucol™, Fa. Baxter, München, D), Maßstabsbalken 5 µm.

Beimpfung der Leitschienen

Tutobone®:

Die ausgestanzten Tutobone®-Plättchen wurden in Fetales Bovines Serum (FBS) eingelegt, zentrifugiert und im Brutschrank 30 Min. vorinkubiert, um eine Benetzung mit FBS an der gesamten Oberfläche der Spongiosa zu erreichen. Damit sollten für die Zellen bessere Haftungseigenschaften erzielt werden. Vor der Beimpfung wurde überschüssiges FBS durch Zentrifugieren entfernt. In einer 48-well-Platte wurde auf die Tutobone®-Plättchen die POB-Zelllösung ($1,0 \times 10^6$ Zellen in 300 µl Nährmedium) aufpipettiert. Die Adhärenzphase betrug zwei Stunden. Währenddessen wurden die Tutobone®-Plättchen in 20-minütigen Abständen gewendet, am Rand befindliche Zellsuspension wurde wieder aufgenommen und erneut von oben aufpipettiert. Nach dem Beimpfungsvorgang wurden die Plättchen in die Bioreaktoren eingelegt und ab dem dritten Versuchsansatz jeweils mit einem speziell angefertigten Aluminiumring fixiert und zentriert. Hierdurch erfolgte eine Trennung der beiden Medienräume.

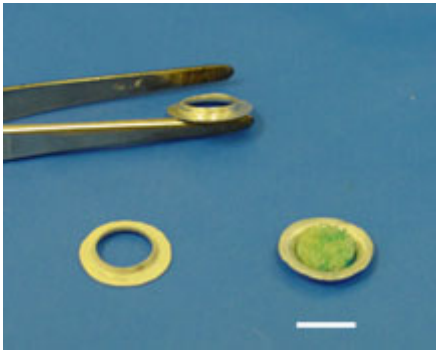


Abb. 3 Aluminiumring zur Fixierung und Zentrierung der knöchernen Leitschiene und zur Abtrennung der beiden Medienräume voneinander, Maßstabsbalken 9 mm.

Fibrinkleber:

Für die Versuchsansätze V und VI wurde das Fertigpräparat Tissucol™ Duo S, für die übrigen Versuchsansätze Tissucol™ Kit Immuno verwendet, wobei sich das Kit in der Handhabung vorteilhafter zeigte. Die Zellkonzentration betrug im ersten Versuchsansatz ca. 1×10^6 , im zweiten $2,5 \times 10^6$ und ab dem dritten Versuch $4,4 \times 10^6$ Zellen pro ml Fibrinkleber. Die Fibrinkleber-Komponenten wurden bei Raumtemperatur mindestens zwei Stunden aufgetaut und anschließend angemischt, indem jeweils die flüssige Phase der Komponente in die Ampulle der festen Phase injiziert wurde. Danach wurden die nach SOP trypsinisierten Chondrozyten mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 200 μl resuspendiert. 100 μl davon wurden jeweils 400 μl der Tissucol™- und 400 μl der Thrombin-Komponente zugesetzt und auf einem Magnetrührer bei 37 °C eingerührt um eine gute Durchmischung und Verteilung der Zellen bei reduzierter Viskosität zu erreichen.

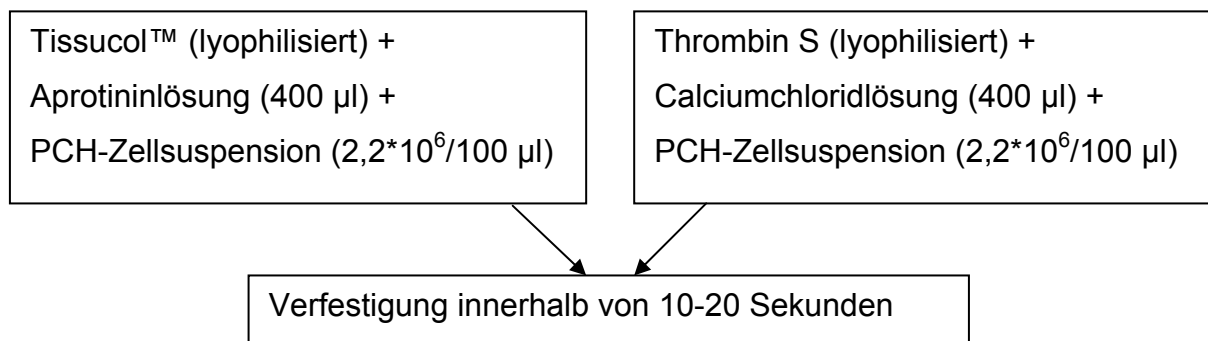


Abb. 4 Herstellung von 1 ml Fibrinkleber mit PCH

Die Einzelkomponenten wurden in je eine Insulinspritze aufgezogen und in das Duploject-System eingelegt. Dieses gewährleistete eine zeitgleiche Applikation von

beiden Komponenten. Pro Versuchsansatz wurde eine 2 - 3 mm hohe Kappe aus 340 µl Fibrinkleber mit $1,5 \times 10^6$ PCH mittels einer 22 G Kanüle auf die knöcherne Leitschiene im Bioreaktor aufgetragen. Sobald sich die Tissucol™-Komponente mit dem Thrombin mischte, begann die Gerinnung und somit die Verfestigung. Nach 10 Min. wurde der Bioreaktor geschlossen und mit der Mediumperfusion begonnen.

Bioreaktor

Für die Differenzierungsphase der Zellen innerhalb der dreidimensionalen Leitschienen wurde als Bioreaktor der Gradient Container der Fa. Minucells and Minutissue ausgewählt. Charakteristisch für diese Art von Kulturkammer ist ein zylinderförmiger Innenraum (\varnothing 10 mm, Höhe 9 mm) mit jeweils zwei Ein- und Ausgängen, über die die Kammer gleichzeitig mit zwei verschiedenen Medien perfundiert werden kann. Über gaspermeable Silikonschläuche wurden die Kammern im oberen Teil mit Medium mit Fibrinolyseinhibitorzusatz, im unteren Teil mit Differenzierungsmedium für Osteoblasten versorgt. Analog dazu verhielt sich die Drainage der verbrauchten Medien. Die kontinuierliche Perfusion mit frischen Nährmedien erfolgte mittels einer Schlauchpumpe, die mit dem Peristaltik-Prinzip arbeitet, wobei die Platzierung der Pumpe im Laufe der Untersuchungen optimiert wurde. Dies war nötig um sicherzustellen, dass die Kammern gleichmäßig von beiden Medien durchströmt werden und dass insbesondere der Fibrinkleber genügend Medium mit Fibrinolyseinhibitor erhält, damit er sich nicht auflöst. Im ersten Versuchsansatz (KoK I) wurde die Pumpe in den abführenden Schenkel eingesetzt, im zweiten und dritten (KoK II, III) in den zuführenden und in den fünf restlichen Versuchsansätzen (KoK IV – VIII) in beide, was "Allschlauchantrieb" genannt wurde. Bei KoK I befanden sich die Behälter mit frischem Medium sowie die Bioreaktoren innerhalb eines Brutschrankes (37° C bei 5 % CO₂-Atmosphäre). Bei den folgenden Versuchsansätzen außerhalb des Brutschrankes wurden die Kammern auf eine Wärmeplatte (Set 39 °C) platziert und die Vorratsgefäße daneben (RT ca. 20 – 24 °C). Die Schlauchpumpe und die Behälter für verbrauchtes Medium befanden sich bei sieben der acht Versuchsansätze außerhalb des Brutschrankes auf einer Arbeitsfläche, nur beim ersten Versuchsansatz befanden sich die Vorratsflaschen und die Kammer noch innerhalb des Brutschrankes.

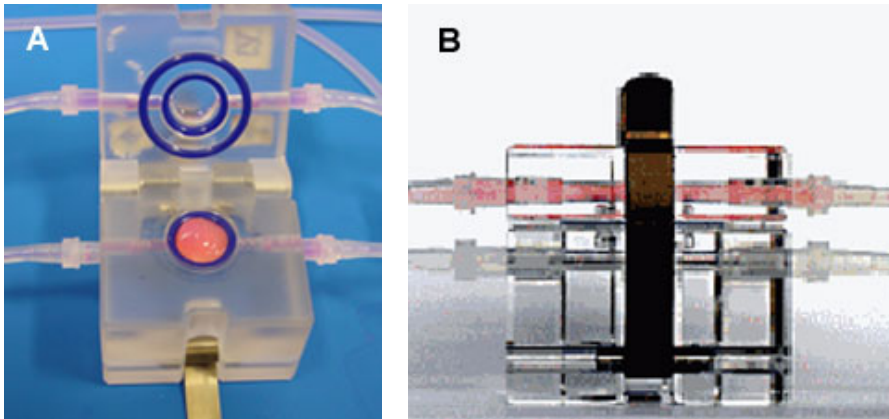


Abb. 5 Bioreaktor (Gradient Container, Fa. Minucells and Minutissue); A) mit eingelegter dreidimensionaler Matrix, überschichtet mit Fibrinkleber, Deckel aufgeklappt; B) Seitenansicht (Bildquelle: Fa. Minucells and Minutissue).

Differenzierungsphase

Bei der ersten Ko-Kultur wurde unter 5%-iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank der pH-Wert mittels des Natriumbikarbonat-Puffersystems konstant gehalten, für alle weiteren Versuchsansätze unter Raumluft wurde Medium mit einem Anteil von 25 mM HEPES-Puffer verwendet. Die Konstrukte wurden in den Kammern kontinuierlich gleichzeitig mit 2 verschiedenen Medien perfundiert. Bei einer Flussrate von 18,1 µl/min entspricht dies einer Gesamtdurchflussrate von 2 x 1 ml/h pro Kammer. Die Menge an Medium wurde so bemessen, dass während der gesamten Versuchslaufzeit von 2 Wochen kein Nachfüllen nötig war. Während der Differenzierungsphase wurden die Kammern täglich in geschlossenem Zustand auf die Ansammlung von Luftblasen hin kontrolliert und ggf. durch kurzzeitiges Schräghalten entfernt.

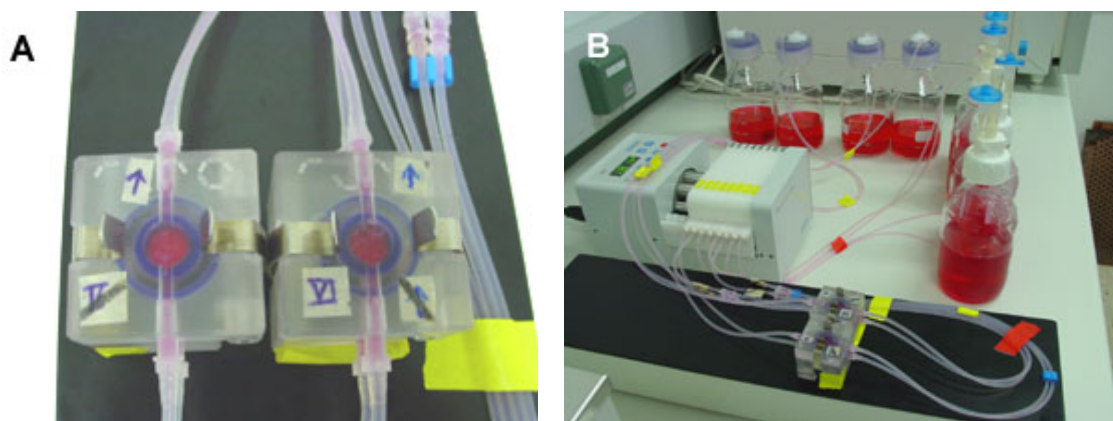


Abb. 6 Versuchsaufbau 3D-Kultur; A) 2 Kammern im Parallelbetrieb auf der Wärmeplatte; B) Gesamtübersicht mit Schlauchpumpe, Vorrats- und Abfallflaschen.

2.3. Versuchsauswertung

Die angewandten Auswertungsmethoden zielten darauf ab, die 3D-Ko-Kulturen hinsichtlich der Kriterien Nachweis der Zellvitalität, Zellwachstum, Zellverteilung, Charakterisierung zelltypischer Produkte und Fibrinkleberpersistenz zu beurteilen.

2.3.1. Aufbereitung der kultivierten Ko-Konstrukte

Aufteilung und Fixierung der Ko-Konstrukte

Jeweils nach Entnahme der Konstrukte aus dem Bioreaktor wurde die makroskopisch erkennbare Morphologie digitalfotografisch dokumentiert. Anschließend wurden die 3D-Ko-Konstrukte für zwei verschiedenartige Fixierungsmethoden mit Skalpell und Hammer zerteilt. Eine Hälfte und ein Drittelstück der Konstrukte wurden in 100% Methanol drei Tage lang fixiert. Das verbleibende Sechstel wurde mindestens eine Woche in Glutaraldehyd (aufsteigende Reihe am ersten Tag: 3 h 0,5%, 3 h 1%, ab dem zweiten Tag dann 2%) fixiert. Nach der Methanolfixierung wurde jeweils die Hälfte in 5%iger EDTA-Lösung entkalkt, gefriergeschnitten und HE-gefärbt bzw. immunhistochemisch markiert. Das Drittelstück wurde in Methylmetacrylat (MMA) eingebettet, gesägt und gefärbt oder zuvor dünn geschliffen und im Anschluss daran mit HE oder nach Laczko-Levai gefärbt. Das Sechstelstück wurde kritischpunktgetrocknet, gefrierbruchgespalten, goldbedampft und anschließend rasterelektronenmikroskopisch analysiert.

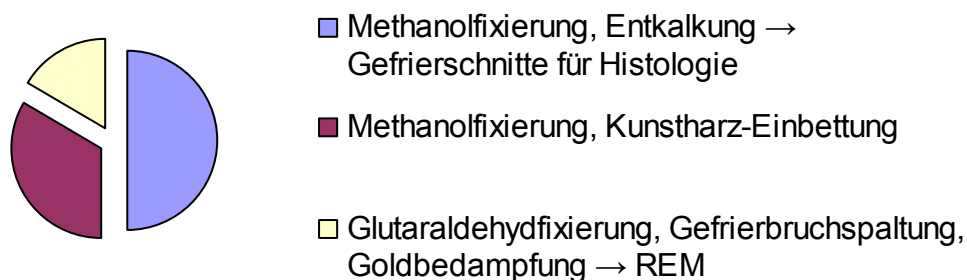


Abb. 7 Schnittschema der Ko-Konstrukte (d = 9 mm) in der Aufsicht.

Anfertigung von Kryoschnitten

Für die histologische und immunhistochemische Auswertung wurden Kryoschnitte angefertigt. Aufgrund der knöchernen Beschaffenheit der Leitschiene mussten die Präparate zunächst entkalkt werden. Die Entkalkung dauerte drei Wochen und erfolgte statisch bei +4 °C in 40 ml 5%-iger EDTA-Lösung. Die EDTA-Lösung wurde

täglich gewechselt. Die entkalkten Proben wurden am Kryostat von der Mitte ausgehend in 12 µm dünne Schichten geschnitten. Dazu wurden die Proben mit Tissue Freezing Medium auf dem Objekthalter so fixiert, dass die Schnittfläche nach oben zeigte und parallel zur Schnittrichtung zu liegen kam. Pro Glasobjektträger wurden drei Schnitte aufgezogen.

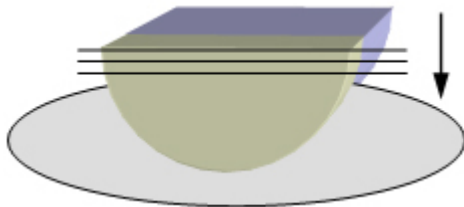


Abb. 8 Schnittschema Kryoschnitte, Pfeil = Richtung der Schnittfolge.

Anfertigung von Schnitten nach MMA-Einbettung

Bei einem Teil der Konstrukte wurden Einbettungen in Methylmetacrylat (MMA) angefertigt. Aus Protokoll 1 im Anhang lassen sich die einzelnen Arbeitsschritte entnehmen. Nach Aushärtung des Methylmetacrylats wurden die Proben mittels einer Bandsäge zugeschnitten und anschließend mittels einer Bandschleifmaschine angeschliffen. Auf Objektträger fixiert wurden an einer Innenlochsäge Schnitte mit einer Stärke von 100 µm hergestellt. Ein Teil der Schnitte wurde dünn geschliffen.

2.3.2. Histologie, Immunhistochemie und Rasterelektronenmikroskopie

Auflichtmikroskopie

Nach drei Tagen Fixierung in Methanol wurden die halbierten Stücke der Ko-Kulturen nativ mittels einer schwach vergrößernden Lupe (Faktor 5,8; 8; 10) begutachtet und in Form von digitalen Bildern dokumentiert. Anschließend wurden die Stücke für die Histologie und Immunhistochemie aufbereitet.

Histologie

Zur histologischen Beurteilung des Zellwachstums wurden Kryoschnitte Hämalaun-Eosin-gefärbt. Von den MMA-Schnitten wurden Hämatoxylin-Erythrosin- und Laczko-Levai-Färbungen angefertigt. Alle Färbungen erfolgten nach allgemein etablierten Protokollen. Zur Konservierung der Präparate wurden die Glasobjektträger mit Deckgläsern und hydrophobem Harz Eukitt eingedeckelt.

Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Markierungen wurden folgende Antikörper verwendet: Knochentypische Marker: Kollagen I, Osteocalcin, Bone Sialoprotein II, Osteonectin, Osteopontin. Knorpeltypische Marker: Kollagen II, IX und die Glykosaminoglykane 3B3+Abc und 2B6+Abc. Die immunhistochemischen Markierungen wurden gemäß Protokoll 2 im Anhang angefertigt. Mit Hilfe eines Fettstiftes wurden auf einem Glasobjektträger einzelne Schnitte abgegrenzt, so dass auf einem Objektträger verschiedene Marker verwendet werden konnten. Die Negativ-Kontrollen wurden nicht mit Primärantikörpern inkubiert. Zur Steigerung der Spezifität der immunhistochemischen Reaktion wurde während der Fixierung der Zellen in Methanol Wasserstoffperoxid beigemischt, welches die endogene Peroxidase inaktiviert. Anschließend wurden die geladenen Molekülgruppen der Zellen durch eine Blockade mit Pferdeserum abgesättigt. Damit wurden unspezifische Bindungen der Primärantikörper weitgehend verhindert. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte mit den ausgewählten Primärantikörpern inkubiert. Danach wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe des Vectastain ABC-Kit Elite nachgewiesen. In diesem Kit war ein biotiniertes Antikörpergemisch aus anti-Maus-Immunglobulin als Sekundärantikörper enthalten. Die Biotinkomponente hatte eine hohe Affinität zum Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex). Dieser ABC-Komplex wandelte wiederum sein Substrat Diaminobenzidin (DAB), eine Nachweissubstanz, in eine unlösliche vernetzte Form um. Die DAB-Lösung wurde gemäß den Herstelleranweisungen in Aqua dest. verdünnt und mit einer Pufferlösung und einem Nickelkomplex angemischt. Durch den Nickelkomplex kam eine schwärzlich-violette Farbgebung zustande. Anschließend wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mittels Eukitt eingedeckelt.

Auswertung und Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen

Von sämtlichen Präparaten wurden lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Aufnahmen wurden mittels eines digitalen Bildverarbeitungssystems bei unterschiedlichen Vergrößerungen erstellt. Es erfolgte methodisch bedingt eine überwiegend deskriptive Auswertung der Ergebnisse.

Rasterelektronenmikroskopie

Zur rasterelektronenmikroskopischen Analyse wurde von 7 Ko-Kulturen je ein Sechstelstück in aufsteigender Glutaraldehyd-Reihe fixiert. Dazu wurden die Präparate für

3 h in 0,5%ige, anschließend für weitere 3 h in 1%ige und zuletzt für mindestens 24 h in 2%ige Glutaraldehyd-Lösung eingelegt. Nach der Kritisch-Punkt-Trocknung im Exsikkator wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefriergebrochen, um eine schneideartefaktfreie Fläche zu erhalten. Anschließend wurden die Ko-Kulturen im Vakuum mit Gold "besputtert". Die mit Gold beschichteten Präparate wurden bis zur Analyse in einem feuchtigkeitsgeschützten Exsikkator aufbewahrt. Im Rasterelektronenmikroskop (Jeol JSM-35 CF, Japan) wurden im Hochvakuum bei einer Spannung von 15 kV Aufnahmen mit dem Rollfilm Ilford FP4 angefertigt. Die Negative wurden eingescannt und mit dem digitalen Bildbearbeitungssystem Adobe Photoshop invertiert.

2.4. Folgeuntersuchungen bei optimiertem Versuchsansatz

Im Rahmen von Folgeuntersuchungen wurden nach Abschluss der Hauptversuche jeweils 3 Knochen-Knorpel-Ko-Kulturen über 2 Wochen und 3 Knochen-Knorpel-Ko-Kulturen über 6 Wochen durchgeführt. Es wurde jeweils das gleiche Leitschienenmaterial verwendet. Innerhalb der Knochenleitschienen wurden kommerziell erhältliche humane Mesenchymale Stammzellen (Fa. Cambrex, Verviers, B) verwendet, welche sich unter Zusatz des unter 2.1.1. beschriebenen Osteogenic Supplement hin zu osteoblastären Zellen differenzieren lassen. Innerhalb der Knorpelleitschienen wurden Patienten-Chondroblasten verwendet, die wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben gewonnen wurden. Im Rahmen der Folgeuntersuchungen sollte insbesondere eine verbesserte Trennung der beiden Medienkompartimente erfolgen. Dadurch sollte zum einen eine zielgerichtete Zelldifferenzierung der beiden Leitschienenkompartimente erfolgen und zum anderen die Ortsstabilität der Zellen innerhalb der Knochenleitschiene sowie der Knorpelleitschiene insgesamt verbessert werden. Dazu mussten zunächst technische Modifikationen am Bioreaktorsystem erfolgen. Im Rahmen des Versuchsansatzes wurde dann zunächst eine zweiwöchige getrennte Vorkultivierung der Knochenkomponente vorgeschaltet sowie eine verbesserte Methode zur Applikation der Knorpelleitschiene zu Beginn der Kokultivierungsphase entwickelt. Langzeitkultivierungen über bis zu 6 Wochen sollten dann zum einen die Durchführbarkeit von Kultivierungen über deutlich längere Zeiträume belegen, zum anderen aber insbesondere die Ortsstabilität der Ko-Konstrukt-Komponenten anhand morphologischer und histologischer bzw. immunhistochemischer Auswertungen.

Technische Modifikation am Bioreaktorsystem

Zur verbesserten Trennung der beiden Medienkompartimente wurden passgenaue Kunststoffhalterungen für die Ko-Konstrukte angefertigt. Diese Halterungen ermöglichen einerseits mittels eines Einsetzwerkzeuges eine exakte Positionierung der Ko-Konstrukte innerhalb der Kulturkammer. Andererseits sollte so eine verbesserte Abtrennung der beiden Medienkompartimente bewirkt werden, mit dem Ziel Shunteffekte und die daraus resultierenden Folgen zu minimieren.

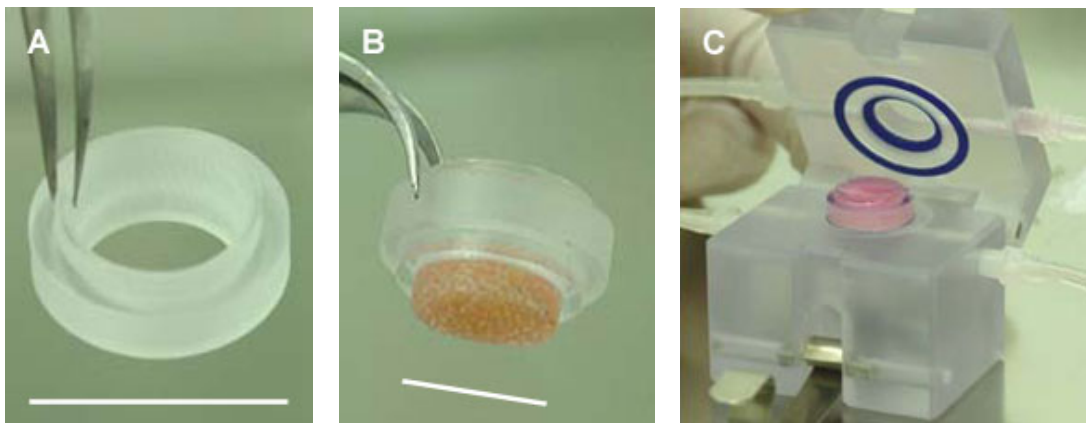


Abb. 9 A) Kunststoffhalterung, Maßstabsbalken 14 mm; B) Eingesetztes Tutobone®-Plättchen, Maßstabsbalken 9 mm; C) Mit Knorpellayer versehenes Konstrukt in Kunststoffhalterung im Bioreaktor eingesetzt.

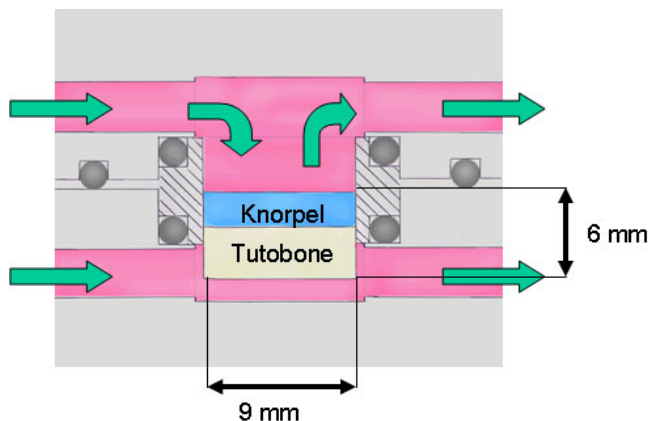


Abb. 10 Schnittschema durch den Bioreaktor mit eingesetzter Kunststoffhalterung (schraffiert) mit Ko-Konstrukt, die hellgrünen Pfeile geben den Flussverlauf der Nährmedien an.

Ortsstabilität der Ko-Konstrukt-Komponenten und Zelldifferenzierung

Um die Ortsstabilität der Zellen innerhalb der Knochenleitschiene zu verbessern, wurde der dynamischen Kultivierung eine statische, von der Knochenleitschiene getrennte Vorkultivierung über einen Zeitraum von 2 Wochen vorgeschaltet. Nach dieser Vorkultivierung sollten die angesiedelten Zellen vollständig ortstabil und bereits

proliferiert sein. Darüber hinaus wurde der Knorpelanteil vor Beginn der dynamischen Kultivierung in Form von vorgefertigten so genannten Knorpellayern appliziert. Die Knorpellayer wurden kurz zuvor in der erforderlichen Stärke von ca. 3 mm in einer Petrischale aus einer Knorpelzell-Fibrinkleber-Suspension gegossen, und nach Verfestigung daraus kreisrunde Layer ausgestanzt. Diese scheibenförmigen Knorpellayer wurden mittels einer dünnen Schicht Fibrinkleber auf die Knochenleitschienen aufgeklebt. Damit sollte verhindert werden, dass zu große Mengen an Fibrinkleber in die Poren der Knochenleitschiene einfließen und die dort angesiedelten Knochenvorläuferzellen verdrängen. Grundlage für eine zielgerichtete Zelldifferenzierung insbesondere innerhalb der Knorpelleitschiene sollte eine verbesserte technische Trennung der beiden Medienkompartimente bewirken, so dass die jeweils auf die beiden Komponenten abgestimmten Medieninhalte zielgerichtet auf die jeweiligen Komponenten einwirken konnten. Dies wurde durch die zuvor beschriebene Kunststoffhalterung angestrebt.

Durchführung von Langzeitkultivierungen über 6 Wochen

Schließlich wurden Langzeitkultivierungen über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt, um zunächst die Durchführbarkeit von deutlich längeren Kultivierungen unter optimierten Bedingungen zu belegen, jedoch insbesondere um die morphologische Entwicklung und die Differenzierung der Zellen nach 6 Wochen Kultivierung anhand von histologischen bzw. immunhistochemischen Auswertungen im Vergleich zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit zu untersuchen.

2.5. Material, Geräte und Werkzeuge

Allgemein

Laborgeräte

Analysenwaage Kern 770	Kern, D
Autoklav Varioklav 300	H+P Labortechnik, D
Brutschrank (+ 37 °C, 5% CO ₂) IG 150	Jouan, Frankreich
Flüssigkeitsabsaugsystem	Laborbestand
Kühl-Gefrierkombination (+ 4 °C, - 20 °C)	Liebherr, D
Laborwaage Kern GJ	Kern, D
Magnetrührer	Laborbestand
pH-Meter inoLab	WTW, D
Pipettierhilfe Accu-Jet	Hirschmann, D
Schüttelgerät Unimax 100	Heidolph, D
Sterilbank Antares 72	Steril S.p.a., Italien

Trockenschrank	Jouan, Frankreich
Vortex-Schüttler	Laborbestand
Wasserbad (+ 37 °C, + 56 °C)	Jouan, Frankreich
Zentrifuge CT 422	Jouan, Frankreich

Labor-Hilfsmittel

Neubauer-Zählkammer	Laborbestand
Mikroliterpipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, D

Material und Verbrauchsmaterial

Einmal-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf, D
Einmal-Skalpelle	Laborbestand
Einmal-Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Laborbestand
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, D
Pasteur-Pipetten (230 mm)	Laborbestand
Petrischalen aus Polystyrol (15 cm)	Laborbestand
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, D
Sterilfilter Minisart	Sartorius, D
Sterilfiltriervorrichtung	Laborbestand
Wägeschälchen	Laborbestand
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, D

Substanzen

Aqua dest.	Laborbestand
Ethanol 70 % in Aqua dest.	Laborbestand
PBS 10 X Ca ⁺⁺ - und Mg ⁺⁺ -frei	Merck, D
Trypanblau	Life Technologies, USA
Trypsin / EDTA (1 X in PBS)	Life Technologies, USA

Versuchsdurchführung

Laborgeräte

Schlauchpumpe IPC N-8	Ismatec, D
Schlauchpumpe IPC N-12	Ismatec, D
Wärmeplatte	Laborbestand

Sonstige Hilfsmittel

Hammer	Baumarkt, D
Locheisen (9 mm)	Baumarkt, D
Meißel	Baumarkt, D

Material und Verbrauchsmaterial

Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Nunc, USA
Zellkulturplatten (48 wells, rund)	Nunc, USA

Versuchsaufbau

Aluminiumblech 400 x 200 x 0,3 mm	Conrad, D
Glasflaschen (500 ml)	Schott Duran, D
Gradient Container (1 x 13 mm)	Minucells, D
Schlauchklemmen	Novodirect, D
Schraubkappen (classic, innovative)	Minucells, D
Silikonschläuche ID 1mm, AD 3mm mit Adapter	Minucells, D
Sterilfilter	Nalgene, D
Stopperschläuche	Ismatec, D

Zellen

Patienten-Osteoblasten	Chir. Klinik der LMU, D
Patienten-Chondrozyten	HNO-Abteilung LMU, D

Leitschienen

Tutobone [®] (25x15x3mm), Best.-Nr. 68326, Lot 7408	Tutogen Medical, D
Tissucol [™] -Kit 2,0 Immuno, lyophilisiert	Baxter, D
Tissucol [™] Duo Quick, Fertigspritzen, Ch. D830699J	Baxter, D

Nährmedium und Mediumzusätze

Aprotinin (Trasylo [®])	Bayer AG, D
Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma, D
Dexamethason, water soluble	Sigma, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, USA
Dulbecco's MEM 25 mM HEPES	Gibco, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, D
L-Glutamin	Sigma, D
Penicillin-Streptomycin	Gibco, USA
β-Glycerophosphat	Sigma, D

VersuchsauswertungLaborgeräte

Digitales Bildverarbeitungssystem KS 400	Zeiss, D
Digitalkamera	Sony, Japan
Exsikkator	Laborbestand
Innenlochsäge SP 1600	Leica, D
Kryostat Vacutome HM 200 OM	Microm, D
Lupenmikroskop M 420	Wild-Leitz, D
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, D
Rasterelektronenmikroskop	Jeol JSM-35 CF, Japan
Wärmeschrank 37°C	Laborbestand
Wasserbad 27 °C	Laborbestand

Material und Verbrauchsmaterial

Deckgläser (24 x 50 mm)	Laborbestand
-------------------------	--------------

Eindecksubstanz Eukitt	Kindler, D
Fettstift für Immunhistochemie (Dako Pen)	Dako, D
Glasobjektträger, beschichtet (75 x 25 x 1 mm)	Menzel, D
Kryostatklingen R 35	Feather, Japan
Tissue Freezing Medium	Jung, D

Substanzen, Allgemein

EDTA 5% in Aqua dest.	Laborbestand
Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%)	Merck, D
Glutaraldehyd-Reihe (0,5%, 1%, 2%)	Laborbestand
Methanol 100 %	Merck, D
PBS 1 X	Merck, D
Sucrose 5% in PBS 1 X	Laborbestand
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Laborbestand
Xylol 100 %	Merck, D

Substanzen, Histologie

Hämatoxylin-Eosin	Merck, D
Mayers Hämalaun	Merck, D
Weigert Färbung	Merck, D

Substanzen, MMA-Einbettung

Aceton	Laborbestand
Benzoylperoxid	Merck, D
Formaldehyd 35 %	Laborbestand
Glucose-Phosphatpuffer isoton pH 7,4	Laborbestand
Methylmetacrylat (MMA)	Merck, D
Plastoid N	Fluka, Schweiz

Substanzen, Immunhistochemie

Pferdeserum	Sigma, D
Vectastain ABC-Kit	Vector, USA

Substanzen, Immunhistochemie, Antikörper

Antikörper	Clone	Dilution	Host	Hersteller
Bonesialoprotein II	WVID1(9C5)	1:5	Maus	DSHB, USA
Glykosaminoglykan	3B3+Abc			
Glykosaminoglykan	2B6+AC			
Kollagen I	Col1	1:2000	Maus	Sigma, D
Kollagen II	CIIC1	1:6	Maus	DSHB, USA
Kollagen IX	D1-9	1:5	Maus	DSHB, USA
Osteocalcin	OC1	1:10	Maus	Dunn, USA
Osteonectin	AON-1	1:5	Maus	DSHB, USA
Osteopontin	MPIIIB10	1:5	Maus	DSHB, USA

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopische Betrachtung

Nach Beendigung der zweiwöchigen Differenzierungsphase in der Perfusionskammer waren die Ko-Konstrukte in ihrer Morphologie größtenteils erhalten. Beim ersten Versuchsansatz (im Brutschrank, Pumpe im abführenden Schenkel, ohne Aluminiumring in der Kammer) war jedoch nur ein Ring erhalten. Zentral war der Fibrinkleber weggespült. Ab dem Einsatz des Aluminiumringes unter "Allschlauchantrieb" trat insbesondere an der Fibrinkleber-Leitschiene kaum mehr Schwund auf. In seiner Konsistenz zeigte sich der Fibrinkleber elastisch bis solide. Die Konstrukte hatten gleich nach Entfernung aus dem Bioreaktor aufgrund des rötlichen Mediums eine blassrosa Färbung, die sich jedoch beim Kontakt mit den Fixierungsflüssigkeiten schnell auswusch.

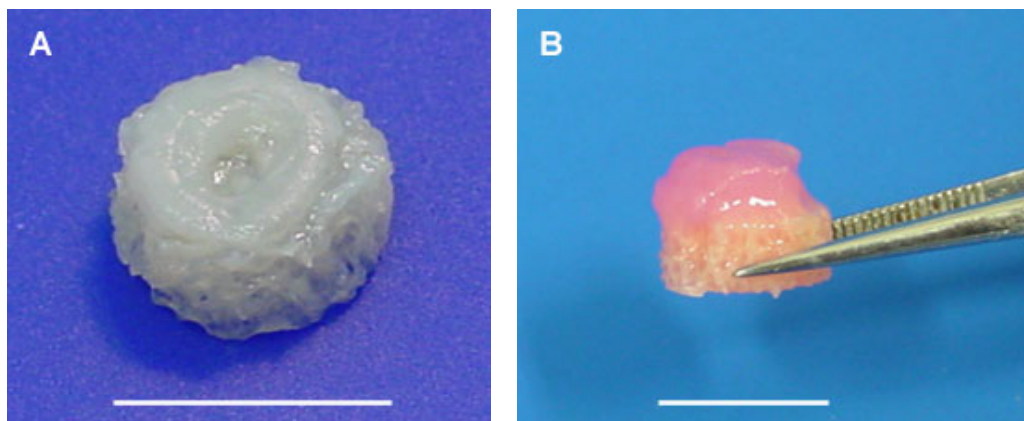


Abb. 11 3D-Ko-Konstrukte nach 2 Wochen Kultivierung; A) KoK I mit Fibrinkleberring und zentraler Ausspülung, Maßstabsbalken 9 mm; B) KoK VII mit erhaltenem, verformtem Fibrinkleber, Maßstabsbalken 9 mm.

3.2. Auflichtmikroskopische Betrachtung

Zunächst wurden die Ko-Konstrukte mittels Auflichtmikroskopie qualitativ beurteilt. Im Vergleich zur Leerprobe ist in den einsehbaren Bereichen der Leitschienen nach 2 Wochen eine deutliche Verengung der Poren der bovinen Spongiosa zu erkennen. Es hat eine Füllung der Poren mit Zellmaterial und Fibrinkleber stattgefunden. Der Fibrinkleber erscheint an seiner Schnittfläche kompakt und annähernd homogen. Der Übergang zwischen den beiden Leitschienen zeigte sich dicht und lückenlos.

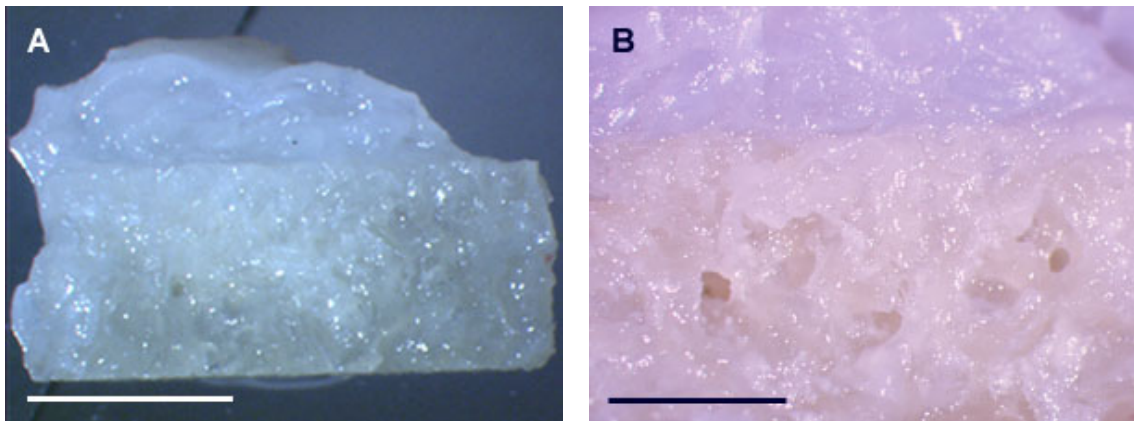


Abb. 12 3D-Ko-Konstrukt nach 2 Wochen Kultur; A) KoK VII mit Übersicht über Schnittfläche nach Halbierung, Maßstabsbalken 3 mm; B) KoK VI mit Detaildarstellung des Übergangs zwischen Knochen- und Knorpelleitschiene, Maßstabsbalken 500 μ m.

3.3. Histologische Auswertung

3.3.1. Histologie nach Anfertigung von Kryoschnitten

Hämalaun-Eosin-gefärbte Kryoschnitte der 3D-Konstrukte wurden in sequentieller Folge von innen nach außen betrachtet. Es zeigte sich in allen Schichten, also sowohl in der Mitte als auch am Rand, dreidimensionales Zellwachstum. Die massiv erkennbaren, stark rosa gefärbten Strukturen entsprechen den Trabekeln der Leitschiene. Die Zellkerne stellen sich basophil, der Fibrinkleber eosinophil dar. In den oberen Abschnitten der knöchernen Leitschiene sind Fibrinkleberfäden und -zapfen mit PCH zu erkennen, die in die Poren der Spongiosa hineinragen (Abb. 13).

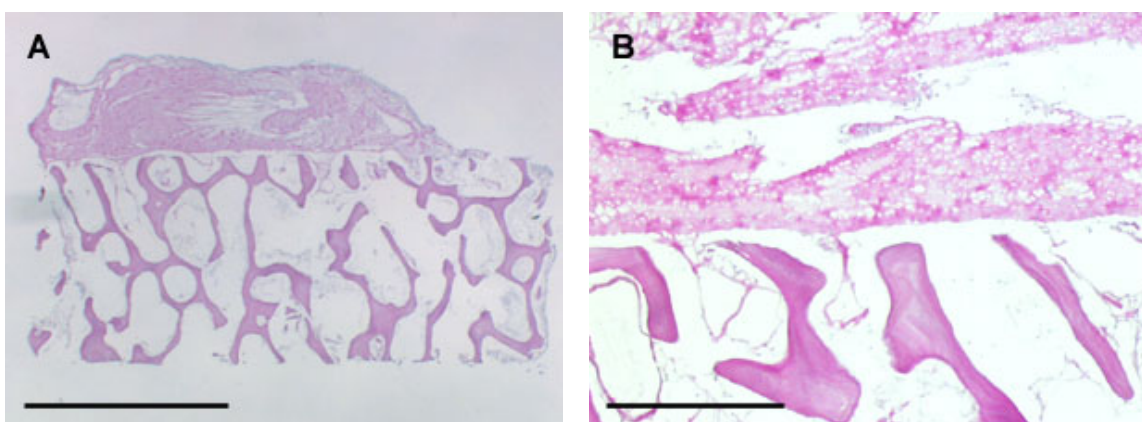


Abb. 13 3D-Ko-Konstrukt nach 2 Wochen Kultur, Kryoschnitt in HE-Färbung; A) KoK VII in der Übersicht, Maßstabsbalken 3 mm; B) KoK VIII in Detaildarstellung des Übergangs zwischen Fibrinkleber und Tutobone[®], Maßstabsbalken 500 μ m.

In den Poren der bovinen Spongiosa zeigten sich zahlreiche POB (Abb. 14), welche jedoch methodisch bedingt in ihrer Morphologie nicht beurteilbar sind.

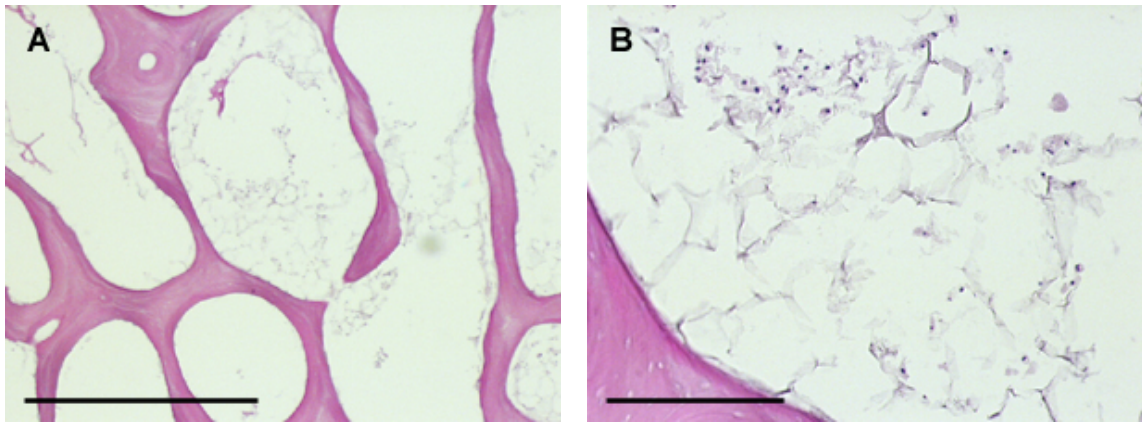


Abb. 14 3D-Ko-Konstrukt knochenähnlicher Anteil nach 2 Wochen Kultur, Kryoschnitt in HE-Färbung, beide Abb. KoK VII, stark rosa: bovine Spongiosa, hell lila: POB; A) Maßstabsbalken 1.000 µm; B) Maßstabsbalken 200 µm.

Im Fibrinkleber stellten sich die PCH zahlreich dar, in ihrer Form rundlich, Chondroblasten ähnlich, teils einzeln, teils in Paaren ähnlich Chondronen angeordnet (Abb. 15). Der Fibrinkleber selbst ist in allen Kryoschnitten aufgrund seiner Netzstruktur mit Blasenartefakten durchsetzt.

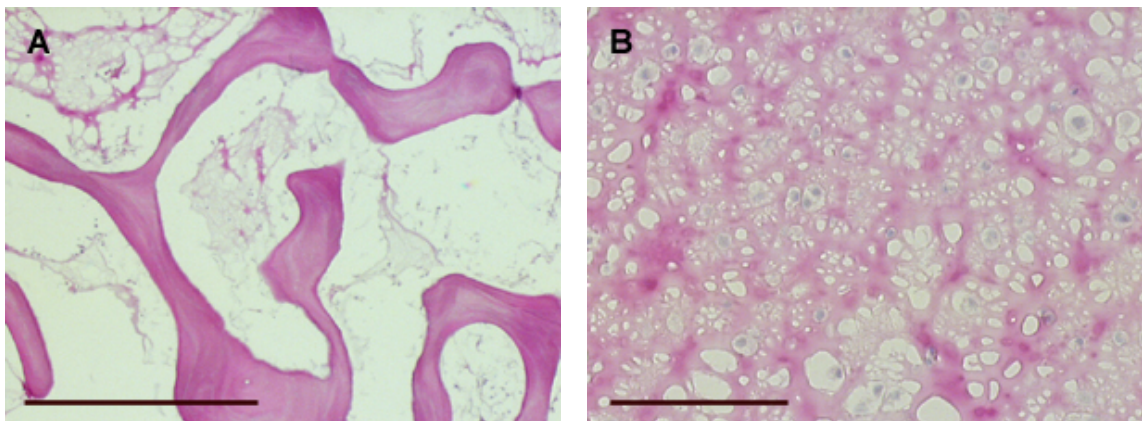


Abb. 15 3D-Ko-Konstrukt knorpelähnlicher Anteil nach 2 Wochen Kultur, Kryoschnitt in HE-Färbung, beide Abb. KoK VIII; A) Bovine Spongiosa mit Fibrinkleber innerhalb der Poren; Maßstabsbalken 1.000 µm; B) Zahlreiche PCH in Fibrinkleber mit Blasenartefakten, teils paarweise angeordnet, Maßstabsbalken 200 µm.

3.3.2. Histologie nach Anfertigung von MMA-Einbettungen

Die morphologisch artefaktfreie Darstellung von dichtem, homogenem Zellwachstum gelang mittels MMA-Einbettungen. In der histologischen Färbung mit Hämatoxylin-

Erythrosin färbten sich die bovinen Spongiosabälkchen kräftig lila, der Fibrinkleber blassrosa und die Zellen blassgrau an (Abb. 16, 17). Der Fibrinkleber stellt sich mit dieser Methode blasenfrei und homogen dar, die Chondrozyten darin sind nur schwach angefärbt, jedoch zahlreich und gleichmäßig verteilt (Abb. 16, 18 links). Die Übergänge zwischen den Leitschienen zeigen sich lückenlos, der Fibrinkleber haftet dicht an der bovinen Spongiosa (Abb. 16, 17 rechts). Von den Trabekeln der Rinderspongiosa ziehen trabekelförmig angeordnete POB zur Gegenseite (Abb. 17 links, 18 rechts).

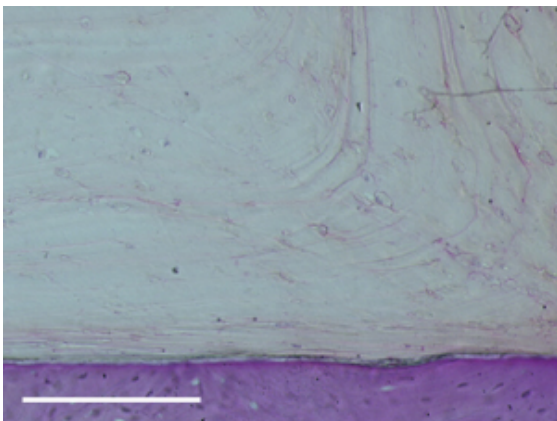


Abb. 16 3D-Ko-Konstrukt nach 2 Wochen Kultur, MMA-Einbettung, KoK VII histologische Färbung mit Hämatoxylin-Erythrosin; Mitte und oben: gleichmäßige Zellverteilung im Fibrinkleber; unten: bovine Spongiosa, Maßstabsbalken 200 μ m.

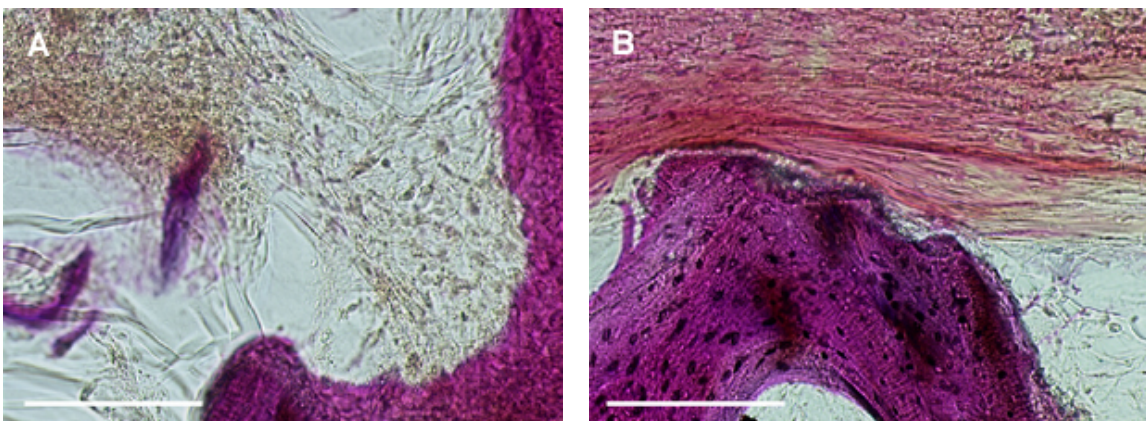


Abb. 17 MMA-Einbettungen, 100 μ m Schichtdicke, HE-gefärbt (dunkellila: bovine Spongiosa, hellgrau: POB, rosa: Fibrinkleber); beide Abb. KoK III; A) dicht angeordnete POB, Maßstabsbalken 200 μ m; B) Übergang zwischen den Leitschienen, Maßstabsbalken 200 μ m.

Mit der Färbung nach Laczko-Levai nehmen die Trabekel eine braune, die Knorpel-leitschiene eine hellblaue und die neu gebildeten POB-Trabekel eine blau-braune Farbe an (Abb. 18).

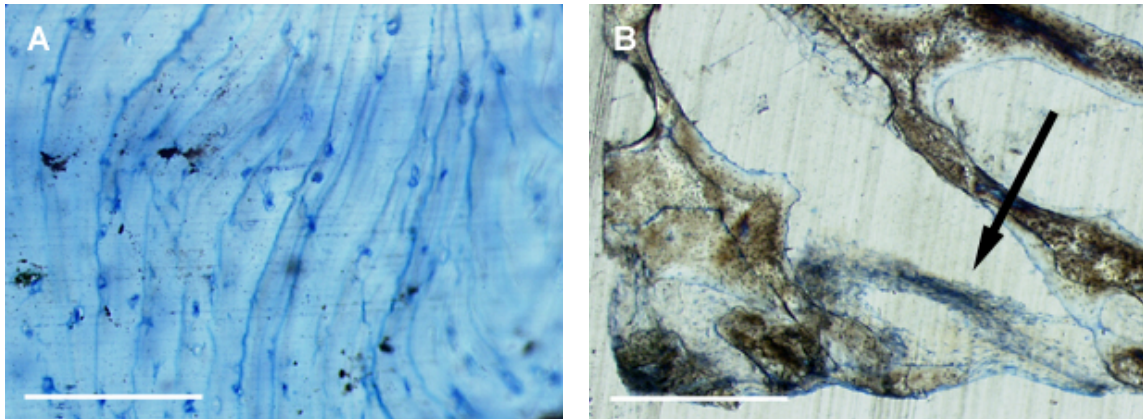


Abb. 18 MMA-Einbettungen, 100 μm Schichtdicke, Färbung nach Laczko-Levai (hellblau: Fibrinkleber, dunkelblau: Zellkerne, braun: bovine Spongiosa); A) KoK VII, PCH in homogenem Fibrinkleber, Maßstabsbalken 200 μm ; B) KoK IV, POB-Bälkchen (Pfeil) verbinden Spongiosabälkchen, Maßstabsbalken 200 μm .

3.4. Auswertung immunhistochemischer Markierungen

Aussagen über die Vitalität der Zellen, die Zelldifferenzierung und über die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix wurden im Wesentlichen anhand der in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Markierungen getroffen. Sieben von acht Ko-Konstrukten wurden mit insgesamt neun Markern immunhistochemisch markiert. Nach folgenden Kriterien wurden die immunhistochemischen Markierungen beurteilt: ++ = positive Reaktion, subjektiv besonders stark gefärbt, + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5 % positive Zellen. Die Negativkontrollen entstanden ohne Applikation von Primärantikörpern. Die in den folgenden Abbildungen jeweils massiv erkennbaren Strukturen entsprechen den Trabekeln der Knochenleitschiene.

3.4.1. Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse

Die Ergebnisse der osteogen stimulierten 3D-Ko-Kulturen im Überblick:

Antikörper	KoK I		KoK II		KoK III		KoK V		KoK VI		KoK VII		KoK VIII	
	POB	PCH	POB	PCH	POB	PCH	POB	PCH	POB	PCH	POB	PCH	POB	PCH
Knochentypische Antikörper														
Kollagen I	+	(+)	++	(+)	++	+	++	(+)	++	+	++	+	+	+
Osteocalcin	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	++	++
Bonesialoprotein II	-	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Osteonectin	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Osteopontin									(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Knorpeltypische Antikörper														
Kollagen II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kollagen IX	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	(+)	-	(+)	-	-
3B3+Abc (Glyk.)	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+
2B6+Abc (Glyk.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++
Negativkontrolle														
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 6 Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen nach 2 Wochen 3D-Kultur mit osteogener Stimulation. ++ = positive Reaktion, subjektiv besonders stark angefärbt, + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen, Glyk. = Glykosaminoglykan

Bei der Beurteilung der 3D-Ko-Kulturen wurde jeweils zwischen dem oberen, knorpelähnlichen und dem unteren, knochenähnlichen Teil des Konstrukts unterschieden. Zur Unterscheidung beider Zellarten wurden knorpel- und knochentypische Marker verwendet. Zu den Markern, die typischerweise Osteoblasten bzw. Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade positiv markierten, gehören Kollagen I, Osteocalcin, Bonesialoprotein II, Osteonectin und Osteopontin. Als knorpeltypische Antikörper wurden Kollagen II und IX und zwei verschiedene Glykosaminoglykane eingesetzt. Im nachfolgenden Text werden nach jeder Aussage die anteiligen Färbeverhalten nochmals in Klammern aufgeführt.

Kollagen I

Die Markierung der Zellen innerhalb der knöchernen Leitschiene fiel überwiegend stark positiv aus (5/7 ++, 2/7 +), die Markierung der Chondrozyten fiel schwach positiv bis positiv aus (4/7 +, 3/7 (+)).

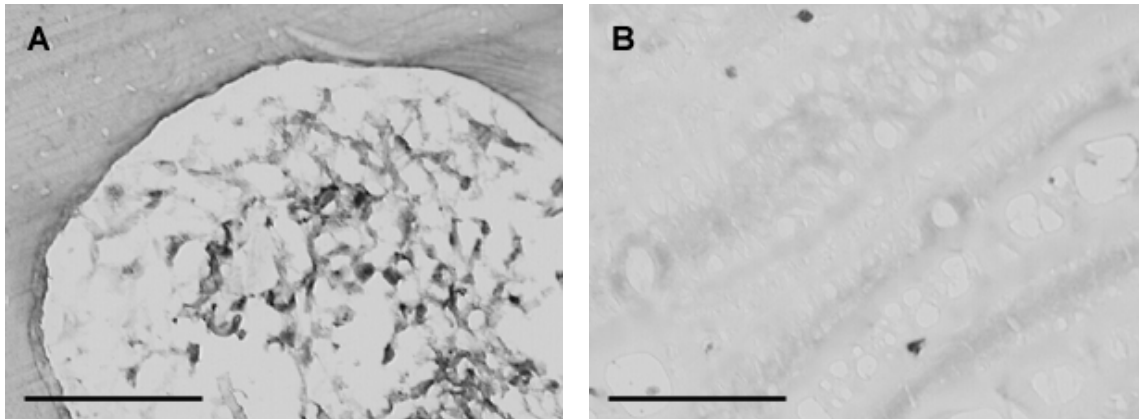


Abb. 19 3D-Ko-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen I; KoK V; A) Knochenanteil, ++ = positive Reaktion, subjektiv besonders stark gefärbt, Maßstabsbalken 200 µm; B) Knorpelanteil, (+) = positive, aber schwache Reaktion, Maßstabsbalken 200 µm.

Osteocalcin

Der Nachweis von Osteocalcin fiel in allen Knochen-Kompartimenten stark positiv aus (7/7 ++), jedoch auch die Chondrozyten ließen sich mit dem Osteocalcin-Antikörper markieren (2/7 ++, 5/7 +).

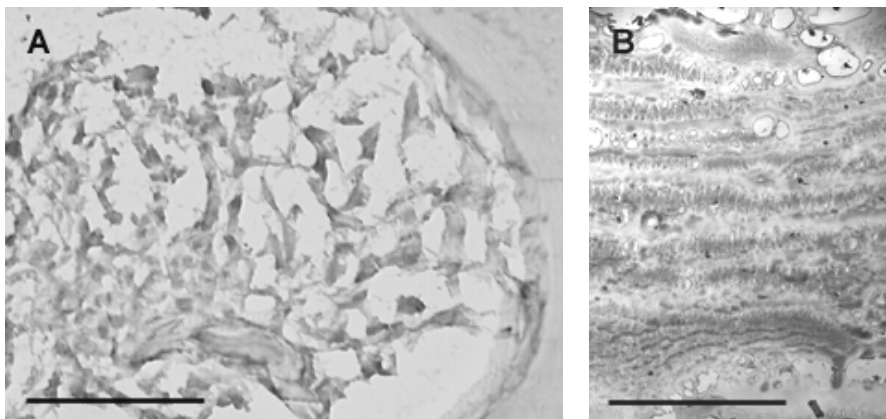


Abb. 20 3D-Ko-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteocalcin, KoK V; A) Knochenanteil, ++ = positive Reaktion, subjektiv besonders stark gefärbt, Maßstabsbalken 200 µm; B) Knorpelanteil, + = positive Reaktion, Maßstabsbalken 200 µm.

Bonesialoprotein II

Im knöchernen Anteil konnte Bonesialoprotein II meist nicht markiert werden (1/7 +, 1/7 (+), 5/7 -). Die Chondrozyten zeigten einheitlich negatives Färbeverhalten (7/7 -).

Osteonectin

Die Markierung von Osteonectin war positiv bis stark positiv und jeweils innerhalb einer Ko-Kultur im oberen und unteren Anteil gleich (beide 3/7 ++, 4/7 +).

Osteopontin

Osteopontin konnte in beiden Anteilen schwach positiv nachgewiesen werden (beide 3/3 (+)).

Kollagen II

Der Nachweis von Kollagen II gelang in keiner der sieben Ko-Kulturen, insbesondere nicht im knorpelähnlichen Anteil (7/7 -, 7/7 -).

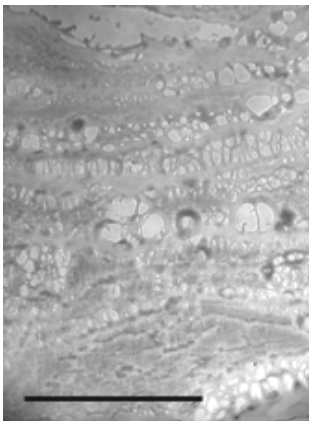


Abb. 21 3D-Ko-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen II, KoK V, Knorpelanteil, - = negative Reaktion, weniger als 5 % positive Zellen, Maßstabsbalken 200 μm .

Kollagen IX

Die Markierung der osteoblastären Zellen mit Kollagen IX fiel negativ aus (1/7 (+), 6/7 -). Das Markierungsverhalten der Chondrozyten gestaltete sich nicht einheitlich, wobei der Nachweis in drei Ko-Kulturen eher positiv und in vier negativ war (1/7 +, 2/7 (+), 4/7 -).

Glykosaminoglykan 3B3+Abc

Die Markierung mit Glykosaminoglykan 3B3+Abc war positiv und jeweils innerhalb einer Ko-Kultur im oberen und unteren Anteil gleich (beide 2/7 ++, 5/7 +).

Glykosaminoglykan 2B6+Abc

Glykosaminoglykan 2B6+Abc war sowohl im oberen als auch im unteren Anteil der Ko-Kulturen immer positiv nachzuweisen (POB 7/7 +; PCH 2/7 ++, 5/7 +).

Negativkontrolle

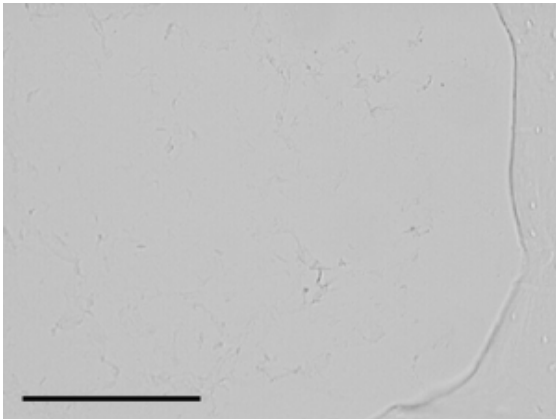


Abb. 22 Kontrolle ohne Applikation von Primärantikörpern, Maßstabsbalken 200 µm.

3.4.2. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

Folgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen dar:

Antigen	3D-Ko-Kultur	
	POB	PCH
Kollagen I	++	(+)+
Osteocalcin	++	+
Bonesialoprotein II	- (+)	-
Osteonectin	+ / ++	+ / ++
Osteopontin	(+)	(+)
Kollagen II	-	-
Kollagen IX	-	- (+)
Glykosaminoglykan 3B3+Abc	+	+
Glykosaminoglykan 2B6+Abc	+	+

Tab. 7 Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen. ++ = positive Reaktion, subjektiv besonders stark angefärbt, + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

3.5. Rasterelektronenmikroskopische Auswertung

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurden die beste räumliche, dreidimensionale Darstellung und die beste Auflösung bei extrem hohen Vergrößerungen erreicht. In der Übersichtsaufnahme stellt sich die homogene Struktur des Fibrinklebers mit engem Kontakt zur knöchernen Leitschiene dar. (Abb.23 links) Die Übergänge zwischen Fibrinkleber und knöcherner Leitschiene gestalten sich fließend, so dass eine exakte Trennlinie zwischen beiden Phasen kaum zu erkennen ist. (Abb.23 rechts).

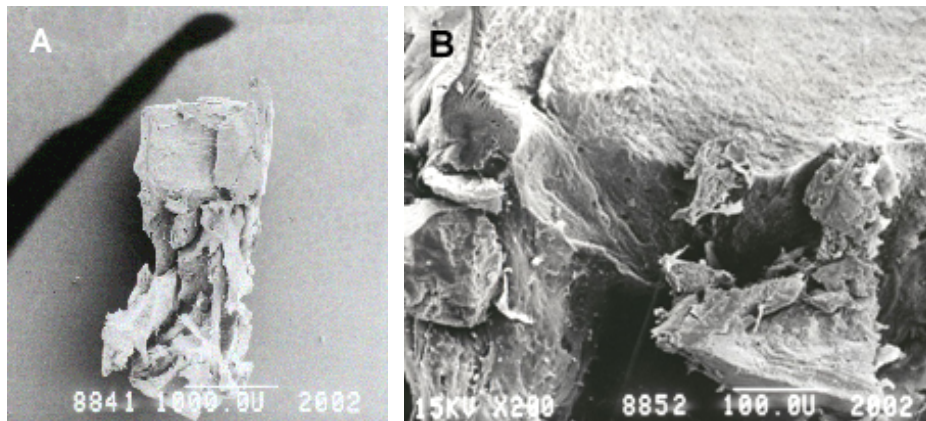


Abb. 23 KoK IV; A) Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme, oben knorpeliger, unten knöcherner Teil, Maßstabsbalken 1.000 μm ; B) Detailaufnahme des Übergangs zwischen beiden Leitschienen, Fibrinkleber ragt in Tutobone[®] hinein, Maßstabsbalken 100 μm .

Beim Blick in die Poren der Spongiosa ist dreidimensionales, jedoch nicht flächendeckendes Zellwachstum zu erkennen. Die sechseckige Wabenstruktur auf den Trabekeln der Tutobone[®]-Leitschiene sind Überreste der bovinen endostalen Saumzellen (ruhende Osteoblasten), welche *in vivo* in Form des Endost die gesamte Innenfläche des Knochens, also auch die Trabekel, als zusammenhängende Zellschicht überziehen. Die Wabenstruktur ist nicht durch die angesiedelten Zellen bedingt. Die Zellkolonisation auf der knöchernen Leitschiene mit POB zeigt sich mehrschichtig, die Zellen treten aus dem Monolayerwachstum heraus und treten mit ihren langen Fortsätzen zueinander in dichten Kontakt, mit denen sie ebenso an der Trabekelwand verankert sind (Abb.24).

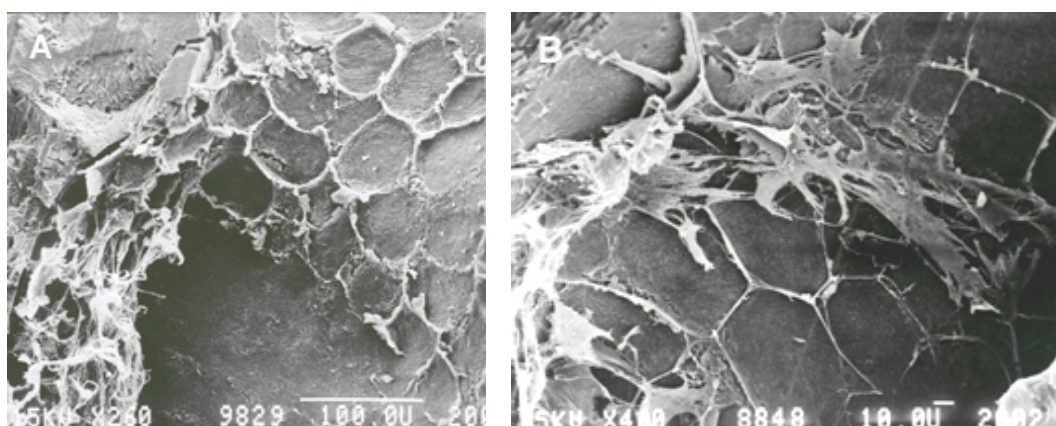


Abb. 24 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der knöchernen Leitschiene (Fläche mit sechseckiger Wabenstruktur) mit darauf kultivierten POB; A) KoK III, Maßstabsbalken 100 μm ; B) KoK IV, Maßstabsbalken 10 μm .

An der Oberfläche des Fibrinklebers ist die verwobene Struktur von sehr zahlreichen Chondrozyten erkennbar, welche über ein dichtes Netzwerk von Zellfortsätzen und

extrazellulärer Matrix miteinander verbunden sind (Abb.25 links). Im Inneren der PCH-Leitschiene, genauer an der gefriergebrochenen Seite des Objekts, zeigt sich ein feinfädiges Fibrinklebernetz mit vereinzelt Hohlräumen. Diese Hohlräume sind 11 μm im Durchmesser groß und entsprechen Zelllakunen der Chondrozyten (Abb.25 rechts).

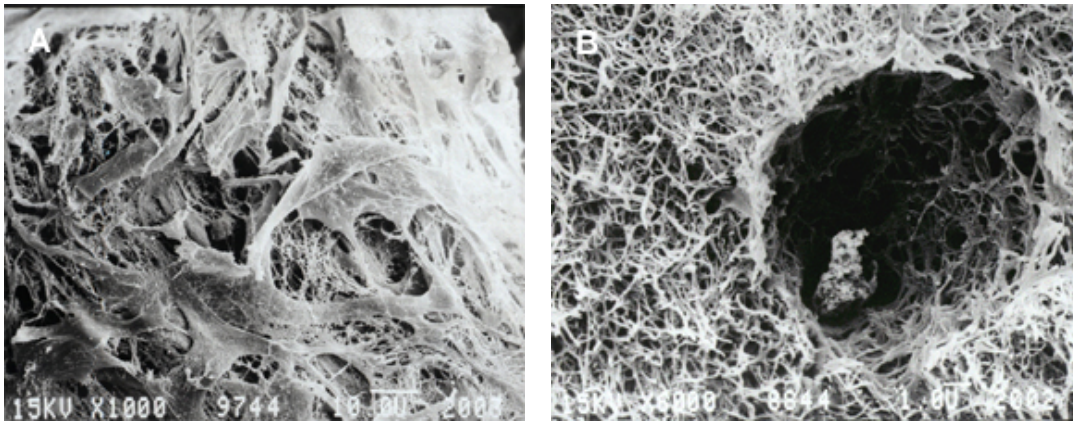


Abb. 25 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrinkleber-Leitschiene; A) KoK VIII, vernetzendes Wachstum von PCH an der Oberfläche, Maßstabsbalken 10 μm ; B) KoK IV, Detailaufnahme einer ca. 11 μm großen Zellakune im Fibrinnetz, Maßstabsbalken 1 μm .

3.6. Folgeuntersuchungen bei optimiertem Versuchsansatz

3.6.1. Technische Modifikationen am Bioreaktorsystem

Bei den über 2 Wochen durchgeführten Versuchsansätzen trat bei einer von drei Ko-Kulturen nach 3 Tagen ein Shunteffekt auf, zu erkennen an der ungleichmäßigen Füllung der Abfallflaschen. Bei den über 6 Wochen durchgeführten Versuchsansätzen trat ebenfalls bei einer von drei Ko-Kulturen nach 2 Wochen ein Shunteffekt auf. Zur Minimierung der Shunteffekte wurde jeweils zusätzlich der abführende Schenkel über die Schlauchpumpe umgeleitet. Alle übrigen Versuchsansätze verliefen unauffällig bis zum jeweiligen regulären Versuchsende.

3.6.2. Ortsstabilität der Ko-Konstrukt-Komponenten

Sowohl nach 2 Wochen als auch nach 6 Wochen in Kultur konnten in allen Versuchsansätzen morphologisch gut erhaltene Ko-Konstrukte gewonnen werden.

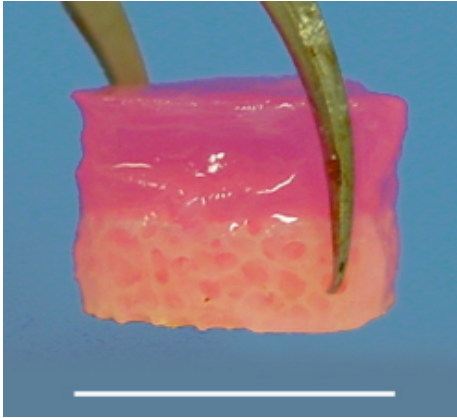


Abb. 26 Ko-Konstrukt nach 6 Wochen in Perfusionskultur mit sehr gut erhaltener Morphologie, Maßstabsbalken 9 mm.

3.6.3. Histologische Auswertung

Toluidinblau-Färbung nach Kryoschnitt

In der Toluidinblau-Färbung zeigte sich nach 6 Wochen Kultivierung im Bereich der Knochen-Knorpel-Übergangszone abgesehen von Zerreißungs- und Blasenartefakten eine homogen besiedelte und nur mit wenig Fibrinkleber infiltrierte Pore innerhalb der Knochenleitschiene.

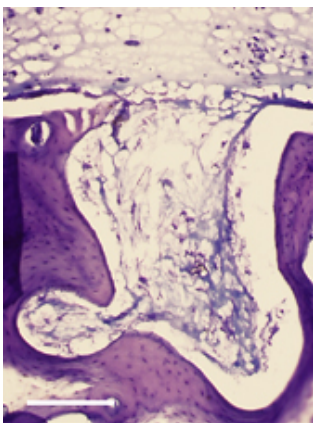


Abb. 27 Ko-Konstrukt nach 6 Wochen in Perfusionskultur, Toluidinblau-Färbung der Knochen-Knorpel-Übergangszone, Maßstabsbalken 200 µm.

Toluidinblau-Färbung nach MMA-Einbettung

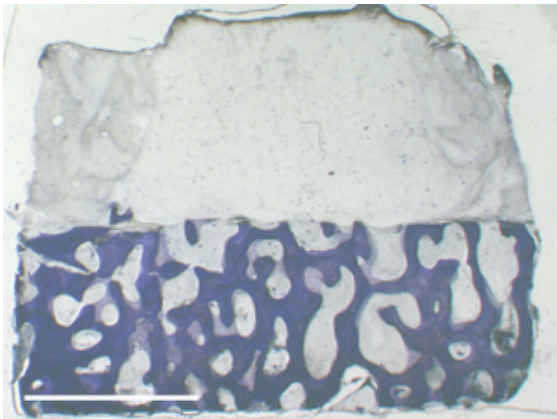


Abb. 28 3D-Ko-Konstrukt nach 6 Wochen Kultur, Toluidinblau-Färbung nach MMA-Einbettung, Maßstabsbalken 3 mm.

3.6.4. Auswertung immunhistochemischer Markierungen

Bei den immunhistochemischen Markierungen der Folgeuntersuchungen wurden Kollagen I-, Osteocalcin- und Kollagen II-Antikörper verwendet. Bei beiden Triplets wurde jeweils eine Ko-Kultur markiert.

Die Ergebnisse der osteogen stimulierten 3D-Ko-Kulturen der Folgeuntersuchungen im Überblick:

	2 Wochen		6 Wochen	
	hMSC	PCH	hMSC	PCH
Knochentypische Antikörper				
Kollagen I	(+)	-	+	+
Osteocalcin	+	+	+	+
Knorpeltypische Antikörper				
Kollagen II	-	(+)	-	-
Kontrolle				
-	-	-	-	-

Tab. 8 Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen nach 2 bzw. 6 Wochen 3D-Kultivierung mit osteogener Stimulation in den Folgeuntersuchungen. ++ = positive Reaktion, subjektiv besonders stark angefärbt, + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5 % positive Zellen

Kollagen I

Die Markierung von Kollagen I war nach 2 Wochen im hMSC-Teil schwach positiv, nach 6 Wochen positiv. Die Chondrozyten exprimierten nach 2 Wochen kein Kollagen I, nach 6 Wochen ließen sich die Chondrozyten positiv nachweisen.

Osteocalcin

Der Nachweis von Osteocalcin war zu beiden Zeitpunkten und jeweils bei beiden Zellarten positiv.

Kollagen II

Kollagen II war im hMSC-Teil nicht nachweisbar. Die Chondrozyten ließen sich nach 2 Wochen noch schwach positiv markieren, nach 6 Wochen erbrachte die Markierung der Chondrozyten ein negatives Ergebnis.

4. Diskussion

4.1. Diskussion von Material und Methoden

Auf dem Gebiet der artifiziellen Geweberegeneration hat sich seit den ersten Veröffentlichungen über das Tissue Engineering von Knochen und Knorpel aus periostalen, *in vitro* kultivierten Zellen zur Therapie von osteochondralen Defekten im Kopf-Hals-Bereich eine rasante Entwicklung vollzogen (Nakahara et al. 1992). Zunehmend gewinnen zellbasierte Methoden mit autologen *in vitro* kultivierten und vordifferenzierten Hybridzellkulturen zur Therapie von Knochen- und Knorpeldefekten neben den proteinbasierten, wachstumsfaktororientierten Ansätzen an Bedeutung (Bruder et al. 1999). Ziel dieser Arbeit war, mittels Tissue Engineering ein osteochondrales Konstrukt herzustellen. Knorpel alleine, unabhängig davon ob tissue-engineerter Knorpel, autologer oder allogener Knorpel, lässt sich in einem osteochondralen Defekt kaum fixieren. Deswegen sollte analog zur autologen Mosaikplastik ein Knochensockel mit einem knorpelähnlichen Überzug generiert werden, der sich *in vivo* gut fixieren lässt. Dabei befinden sich nicht nur in der Knorpel-Leitschiene Chondrozyten, sondern auch in der Knochen-Leitschiene Osteoblasten, um ein besseres Einwachsen und Remodeling des osteogenen Trägermaterials in den Empfänger-Knochen zu gewährleisten. Hauptaufgabe war dabei die in Kapitel 1.2.2., 1.2.5. und 1.3. gestellten Anforderungen für dreidimensionale Knochen-Knorpel-Ko-Kulturen umzusetzen. Der hierzu entwickelte "Allschlauchantrieb" und die bessere räumliche Abgrenzung durch Einsatz eines Aluminiumringes bzw. in den Folgeuntersuchungen einer Kunststoffhalterung (siehe Kap. 2.2. und 2.4.) im Bioreaktor sollte gewährleisten, dass die Mediumversorgung beiden Teilen gerecht wird, indem die beiden verschiedenen Medien so gut wie möglich von einander getrennt werden sollten. Die kritische Auswertung der mit dieser neu entwickelten Methode durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Wachstumseigenschaften von Zellen zeigte, dass sich mit diesem System Osteocalcin- und Kollagen I-positive osteoblastenähnliche Zellen in lösungsmittelkonservierter, gamma-strahlensterilisierter Rinderspongiosa und darauf glykosaminoglykan-positive chondrozytenähnliche Zellen in Fibrinkleber über einen Zeitraum von 2 Wochen in hoher Zahl und Dichte kultivieren lassen. Unter kontinuierlicher räumlich getrennter Perfusion der Zellen in den Kulturkammern kam es dabei zu einem relativ gleichmäßigen Wachstum innerhalb des gesamten Trägerma-

terials, sowohl intertrabekulär als auch im Fibrinnetz. In keiner der acht Ko-Kulturen trat während der 2-wöchigen Differenzierungsphase eine Verkeimung auf.

4.1.1. Festlegung der Beurteilungskriterien

Das Knochen- und Knorpelzellwachstum im dreidimensionalen Kokultursystem wurde im Rahmen der Etablierung dieser Methode hinsichtlich folgender Kriterien beurteilt: Fibrinkleberpersistenz, Morphologie, Stabilität der Knochen-Knorpel-Verbindung bei Auftreten von Scherkräften, Histomorphologie, Zellmenge, Zellverteilung, Anordnung der Zellen, Zellvitalität und Produktion von extrazellulärer Matrix und knochen- und knorpeltypischen Proteinen.

4.1.2. Material und Methoden im Rahmen der Versuchsansätze

Neben der Etablierung eines Kultursystems, in dem Chondrozyten und Osteoblasten auf zwei verschiedenen Leitschienen miteinander kultiviert werden können, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit Patientenzellen zu verwenden sowie Trägermaterialien, die im klinischen Gebrauch bereits zugelassen sind. Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen, die biphasische Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukte entwickelten, ist die Zusammensetzung der Konstrukte einer potentiellen klinischen Anwendung sehr nahe (Nakaoka et al. 2006, Jiang et al. 2005, Mahmoudifar et al. 2005, Chang et al. 2004, Cao et al. 2003).

Bei einer der vielen verschiedenen Verfahren, Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukte herzustellen, wurde frisch abpräpariertes Periost vom Rind um ein Co-Polymer aus Polyglykol- und Poly-L-Laktid-Säure gewickelt. Separate Plättchen aus PGA wurden mit Chondrozyten und Tenozyten von Kälberschultern besiedelt. Beide besiedelten Leitschienen wurden eine Woche lang getrennt voneinander in verschiedenen Medien statisch vorkultiviert. Anschließend wurden die beiden Komponenten mittels Nähten zusammengefügt und subkutan in athyme Nacktmäuse implantiert. Nach 20 bzw. 40 Wochen *in vivo* resultierte hieraus neu gebildetes Gewebe in der vorher festgelegten Form und Dimension einer humanen Phalanx mit Gelenkfläche. Die histologische Untersuchung ergab laut den Angaben des Autors reifen Gelenknorpel und subchondralen Knochen mit einer Gelenkkapsel. Insgesamt hatte dieses Konstrukt eine einem humanen Fingermittelglied mit zwei Gelenkflächen ähnliche Struktur (Isogai et al. 1999). Kritisch anzumerken ist jedoch der vergleichsweise undifferenzierte Um-

gang mit der Nomenklatur der Objekte. Auch wenn sich in diesen Konstrukten die Zellen sehr gut integriert haben, sehr viel neues Gewebe darin entstanden ist und die Leitschienen auf 5 % ihrer Ausgangsgröße abgebaut wurden, muss dennoch in Frage gestellt werden, ob die Verwendung der Begriffe "reiner Knochen" und "reiner Knorpel" zutreffend ist. Ein weiterer Schwachpunkt aus Sicht der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung von synthetisierten Leitschienenmaterialien, die vor der klinischen Anwendung zunächst ein Zulassungsverfahren durchlaufen müssten. Vor bereits 6 Jahren wurde der erste und bislang einzige Fallbericht über den Ersatz eines verlorenen Daumenendgliedes durch ein tissue-engineertes Endglied aus periostalen Zellen in Alginat und Hydroxylapatit publiziert. Aus Sicht der durchführenden Chirurgen wurde damit eine gute biomechanische Stabilität erreicht (Vacanti et al. 2001). Dieser bislang einzige Einsatz eines tissue-engineerten Knochen-Knorpel-Konstruktes wurde jedoch aufgrund seines eher schlechteren Outcomes insbesondere hinsichtlich der Funktionalität im Vergleich zu den etablierten Behandlungsmethoden zur Rekonstruktion eines Daumengliedes in Frage gestellt (Hentz et al. 2001).

In einer anderen *in vitro* Studie wurde als Leitschiene ein poröses, mittels Rapid Prototyping (Begriffserklärung in Kap. 4.4.3.) hergestelltes Polycaprolactongerüst verwendet, welches in einer Hälfte mit osteogenen Zellen in Fibrinkleber besiedelt und kultiviert wurde. 18 Tage später wurde die andere Hälfte derselben Leitschiene mit chondrogenen Zellen in Fibrinkleber beimpft. Die Zellen waren humane Zellen, gewonnen aus dem Beckenkamm und einer Rippe. Anschließend wurden die Konstrukte in einem Ko-Kultur-Medium unter statischen Bedingungen 32 Tage weiter kultiviert. Beide Zellarten proliferierten, wanderten in die Leitschiene ein und gingen im Übergangsbereich ineinander über. Im mit osteogenen Zellen besiedelten Teil zeigten sich mineralisierte Knötchen und hohe Osteocalcin-Spiegel. Eine Auswertung bezüglich knorpelspezifischer Marker erfolgte jedoch nicht (Cao et al. 2003). Auch in dieser Untersuchung lassen sich mehrere Kritikpunkte finden: Es wurde nur eine Leitschiene verwendet und ab dem 18. Tag nur ein Medium, das beide Teile versorgte. Dieses Ko-Kultur-Medium, das sich vom vorhergehenden Medium nur im Grundmedium unterschied (45 % M199 + 45 % Ham's F-12 vs. 90 % M 199 zuvor) enthielt Osteogenic Supplement, womit in diesem Fall offensichtlich bewusst auch die Chondrozyten osteogen stimuliert wurden. Zusätzlich bestehen Schwächen in den Auswertemethoden. Es wurden 3 visuell-deskriptive sowie ein Enzymmessverfahren angewendet. Alkalische Phosphatase und Osteocalcin wurden kurz vor der Besiede-

lung mit Chondrozyten sowie am 43. Tag im Mediumüberstand gemessen und jeweils mit unbesiedelten Kontrollen verglichen. Wie die Autoren jedoch in der Messung am 43. Tag genau bestimmen konnten, von welcher Zellart welche Proteine synthetisiert wurden, bleibt unklar. Ob von den mit Osteogenic Supplement stimulierten Chondrozyten Osteocalcin gebildet wurde, ist daher nicht auszuschließen. Die topographische Bestimmung der Osteocalcinproduktion mittels immunhistochemischer Markierung wurde bei dieser Arbeit aus Singapur nicht durchgeführt. Widersprüchlich zu den Ergebnissen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist, dass bei Cao die osteochondralen Ko-Konstrukte nach gemeinsamer Kultur insgesamt nicht nur deutlich weniger Osteocalcin als zum ersten Messzeitpunkt produzierten, sondern sogar noch weniger als die unbesiedelten Kontrollen. Hingegen exprimierten in der vorliegenden Arbeit nicht nur die POB sondern auch die PCH Osteocalcin (siehe Kap. 3.4.1., 3.6.4. und 4.2.4.). Cao hatte für den Rückgang der Osteocalcinproduktion nach Hinzufügen der Chondrozyten ins System davon abgesehen auch keine suffiziente Erklärung. Die Autoren mutmaßten, dass entweder ein Verdünnungseffekt aufgetreten sei oder dass ein unbekannter Prozess zu einer osteoblastären Dysfunktion geführt haben könnte.

In einer anderen Studie wurden in einem Tiermodell osteochondrale Defekte im Kniegelenk von Kaninchen mit tissue-engineerten biphasischen Konstrukten gefüllt. Dabei wurde eine Kalziumphosphat-Komponente ohne Zellen in den Defekt (3 mm Durchmesser, 3 mm Höhe) injiziert und während des Aushärtens ein Schwamm aus einem Hyaluronsäure-Derivat darüber gelegt. Ein Teil der Hyaluronsäure-Schwämme wurde mit autologen Progenitor-Zellen besiedelt, die aus Knochenmark gewonnen wurden. Die Kontroll-Konstrukte wurden unbesiedelt in die Defekte implantiert. Nach 12 Wochen *in vivo* zeichneten sich die verschiedenen Zonen im Reparaturgewebe deutlich voneinander ab, wobei die Chondrozyten teils in säulenförmiger Anordnung vorlagen. Dabei wurden besiedelte Implantate besser integriert und wiesen eine höhere Zelldichte auf als unbesiedelte (Gao et al. 2002). Diese Untersuchung stützt unsere Annahme, dass die Besiedelung von osteochondralen Implantaten mit Zellen die Integration in den Empfängerknochen und –knorpel verbessert. Fraglich an dieser Studie bleibt jedoch, ob die Auswahl der Versuchstiere gut getroffen wurde. Die verwendeten so genannten "erwachsenen" New Zealand White Rabbits waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 18 Wochen alt. Nach Angaben einer anderen Studie hingegen ist das Skelettwachstum dieser Tierart erst mit 28 Wochen abgeschlossen

(Masoud et al. 1986). Daher lässt sich die Frage aufwerfen, ob die Ergebnisse deshalb so gut ausfielen, weil eventuell das Regenerationspotential der noch nicht komplett ausgewachsenen Kaninchen einen erheblichen Beitrag dazu leistete. Ein Hinweis darauf wären die nicht als schlecht zu wertenden Ergebnisse der unbesiedelten Kontrollen.

4.1.2.1. Zellen

Bei der Herstellung eines osteochondralen Implantates mittels Tissue Engineering muss stets die grundlegende Frage nach der Herkunft der Zellen gestellt werden. Zu Beginn muss die Entscheidung getroffen werden, ob autologe oder allogene Zellen verwendet werden sollen. Dabei haben allogene Zellen den Vorteil der leichteren Verfügbarkeit, da sie über Knochenbanken bezogen werden können, jedoch entscheidende Nachteile hinsichtlich Immunabwehrreaktionen durch Oberflächenantigene sowie Infektionsgefahren (Stützle et al. 1991). Autologe Zellen hingegen bergen diesbezüglich nur geringe Gefahren, sind jedoch in nur sehr begrenztem Maße verfügbar. Es ist anzunehmen, dass bei einer Re-Implantation von autologen Zellen keine Immunsuppression nötig ist. Deshalb ist diese Zellart deutlich zu bevorzugen. Quelle der Zellen waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mittelfußknochen aus Teilamputationen sowie Knorpelreste infolge von Korrekturingriffen bei Nasenseptumdeviationen. Es muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei Zellen der genannten Herkunft um ein heterogenes Zellgemisch handelt, in dem verschiedene Differenzierungsstufen von der Vorläuferzelle bis zum Osteo-/Chondrozyten vorhanden sind. Es ist fraglich, ob die genannten Entnahmestellen bei zukünftigen Tissue Engineering Therapien die Stellen erster Wahl sind. Als Entnahmestellen wären eher Stellen denkbar, die zum einen leicht zugänglich sind und keine tragende Funktion erfüllen wie z.B. Beckenkamm-Knochen oder Rippen-Knorpel. In dem bislang einzigen Fall einer Anwendung eines tissue-engineerten osteochondralen Konstruktes, ein Daumenendglied aus Alginat und Hydroxylapatit mit periostalen Zellen, wurden Zellen aus dem Periost des Radius verwendet (Vacanti et al. 2001). Chondrozyten für den knorpel-ähnlichen Anteil könnten sowohl aus dem Nasenseptum als auch aus einem Gelenk oder einer Rippe gewonnen werden. In einer neueren Studie wurden bovine Chondrozyten aus verschiedenen Entnahmestellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften beim Tissue Engineering von Knorpel miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass sich die Chondrozyten aus den verschiedenen Entnahmestellen bei der

Herstellung von neuem Knorpel unterschiedlich verhielten. Beispielsweise exprimierten Chondrozyten costalen und nasoseptalen Ursprungs höhere Mengen an Kollagen II und Aggrecan, wohingegen aurikuläre Chondrozyten nach 20 Wochen in Kultur als einzige elastische Fasern produzierten. (Isogai et al. 2006). Welche Entnahmestelle für das Tissue Engineering von Gelenkknorpel die günstigste ist, muss Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Die Zellgewinnung kann mittels verschiedener Isolationstechniken erfolgen. Zum einen kann im Rahmen einer Explantkultur Gewebe zerkleinert werden, woraufhin aus den Gewebestückchen langsam Zellen auswachsen (Freshney 1990). Zum anderen können Zellen mittels Kollagenaseverdau aus ihrem Verbund herausgelöst werden (Minuth et al. 2002). Vorteil der Kollagenaseverdau-Methode ist die schnellere Gewinnung der Zellen. Unklar bleibt jedoch, ob die Zellen bei dieser Methode gänzlich unversehrt bleiben. Mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Explantkultur-Methode wurden jedoch auch in einem akzeptablen Zeitraum ausreichende Mengen an Zellen generiert.

Letztendlich muss bei der Entnahme von autologem Zellmaterial ein Kompromiss vollzogen werden. Je geringer die Ausgangszellzahl ist, desto geringer ist die donor site morbidity aber desto länger ist die Proliferationsphase. Je länger die Proliferationsphase ist, desto stärker dedifferenzieren die Zellen. Die Dedifferenzierung der Zellen in 2D-Kultur ist eine seit mehr als 25 Jahren bekannte Eigenschaft, mit der man sich beim Tissue Engineering konfrontiert sieht (Grundmann et al. 1980). Doch lassen sich sowohl undifferenzierte Progenitorzellen als auch dedifferenzierte Zellen durch verschiedene Möglichkeiten differenzieren bzw. redifferenzieren. Mit Osteogenic Supplement als Mediumzusatz können nicht nur isolierte hMSC, sondern auch osteoblastenähnliche Zellen aus Knochenmarkzellkulturen in höhere Differenzierungsstufen überführt werden (Coelho et al. 2000).

Es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass nicht nur entsprechende Differenzierungsfaktoren, sondern auch die Anordnung in der Dreidimensionalität, die Zelldichte und auch mechanische Kräfte oder Anregung mittels Schallwellen eine zelldifferenzierende Wirkung besitzen (Park et al. 2006, Cui et al. 2006, Benya et al. 1982). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam zum einen ein osteogener Differenzierungszusatz zum Einsatz, zum anderen befanden sich die Zellen zwei Wochen in einer dreidimensionalen Anordnung bei hoher Zelldichte. Die osteogene Differenzierung hatte einen Effekt auf die POB hinsichtlich der Produktion von knochentypischen Markern

(siehe Kap. 3.4.1., 3.6.4. und 4.2.4.). Auf den Zusatz chondrogener Differenzierungsfaktoren im Knorpelmedium wurde verzichtet, um zu untersuchen, ob eine dreidimensionale Anordnung bei hoher Zelldichte alleine zur Differenzierung ausreicht. Welche Auswirkung dies auf die PCH hatte und insbesondere, ob hierdurch das Osteogenic Supplement auf die Chondrozyten eine in Richtung osteogene Differenzierungskaskade differenzierende Wirkung hatte, wird im Rahmen der Diskussion der immunhistochemischen Auswertung erörtert (Kap. 4.2.4.).

Beim Tissue Engineering von osteochondralen Implantaten können verschiedene Zellarten verwendet werden. Es stehen hMSC bzw. BMSC (Bone Marrow Stromal Cells), transfizierte Zellen, osteoblastenähnliche bzw. chondrozytenähnliche Zellen und Periostzellen zur Verfügung (siehe Kap. 1.2.1.). Aus ethischer Sicht sind die adulten hMSC im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen unbedenklich (Niemeyer et al. 2004). Der Vorteil bei Verwendung von hMSC gegenüber Osteoblasten besteht in der Gewinnung aus Knochenmark und der damit verbundenen geringeren donor site morbidity. Schwierig ist allerdings die Gewinnung einer ausreichenden Zahl von hMSC, da diese im Knochenmark nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden sind und damit eine längere Proliferationsphase und eine intensive Differenzierung erforderlich ist. Zudem sind hMSC nicht in sehr viel kürzeren Zyklen passagierbar als Osteoblasten. In einem Vergleich zwischen Periostzellen versus BMSC zeigte sich, dass Periostzellen zwar schneller proliferieren, aber BMSC noch mehr in Richtung osteoblastäre Linie differenzieren (Agata et al. 2007). Ein weiterer Vorteil der BMSC wäre aber auch die mögliche Verwendung dieser Zellart für beide Kompartimente. Histologische Untersuchungen von mit BMSC besiedelten biphasischen PCL-Leitschienen in Kniegelenken von Kaninchen ergaben zumindest positive immunhistochemische Markierungen für Kollagen Typ II und Glykosaminoglykan (Shao et al. 2006). Dadurch würde Patienten in Zukunft eine Entnahme von Zellmaterial an zwei Stellen erspart bleiben. Ob diese Ergebnisse vom Kaninchen auf den Menschen übertragbar sind, wird Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein müssen.

Folgeuntersuchungen

Im Rahmen der Folgeuntersuchungen wurden innerhalb der Knochenleitschiene statt Patienten-Osteoblasten hMSC und innerhalb der Knorpelleitschiene wie in den Hauptuntersuchungen Patienten-Chondrozyten verwendet.

4.1.2.2. Leitschienen

Die Leitschienen bovine Spongiosa und Fibrinkleber wurden aufgrund der in Kapitel 1.2.2. gestellten Anforderungen ausgewählt. Zudem erfüllten sie das Kriterium, dass beide bereits seit längerer Zeit in klinischem Gebrauch sind und somit Genehmigungsverfahren für die Anwendungszulassung am Menschen entfallen. Tutobone[®], eine mit dem Tutoplast[®]-Verfahren speziell verarbeitete bovine Spongiosa, bietet viele Vorteile anderen Leitschienen gegenüber. Zum einen ist es deutlich belastungsstabiler als Knochen, der mit Hitzeverfahren sterilisiert wurde (Knaepler et al. 1991). In eigenen Vorversuchen zeigte sich, dass eine andersartig konservierte Spongiosa bei gleicher Kraffteinwirkung zerbröselte und zusammensinterte. Zum anderen ist Tutobone[®] im Gegensatz zu demineralisiertem Knochen formstabil (Benninghoff et al. 2002). Tutobone[®] besitzt zudem gute osteoinduktive und gute Oberflächeneigenschaften. Es ist nicht ganz glatt, sondern es besteht eine gewisse Rauigkeit der Oberfläche, die die Anhaftung der Zellen während der Besiedelung begünstigt (Boyan et al. 1996). Eine lange Degradationszeit *in vivo* könnte den Zellen langfristig eine stabile Matrix liefern. Unvorteilhaft wäre lediglich, dass sich Tutobone[®] mittels konventioneller Röntgentechniken schlecht vom Empfängerknochen unterscheiden ließe. Dies hätte zur Folge, dass sich das Einwachsen von neuem Knochengewebe sowie der zeitgleich stattfindende Aufbau von eigenem Knochen und der Abbau von Tutobone[®] einer radiologischen Verlaufskontrolle entziehen würden. Da Tutobone[®] ein "Naturprodukt" ist, liegt es somit in der Sache, dass sich die einzelnen Leitschienen-Stückchen nicht exakt gleichen. Auch innerhalb einer Charge kann es deutliche Unterschiede in den Porengrößen (150 µm – 900 µm) geben, je nachdem, ob ein Stückchen aus einem Bereich näher oder ferner der Kompakta stammt. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich dies nicht negativ auf das Zellwachstum auswirkt (Frosch et al. 2002). Es wäre theoretisch auch möglich, dass durch die natürliche Unregelmäßigkeit der Poren zum einen das Wachstum der Zellen, zum anderen aber auch das Einwachsen von Gefäßen gefördert wird. Ungünstige Effekte durch die Varianz der Porengrößen könnte es jedoch eventuell bei der Besiedelung geben.

Tissucol[™], ein aus Humanplasma hergestellter Fibrinkleber, wurde als Leitschiene für die Chondrozyten verwendet. Die Handhabung des Fibrinklebers stellte sich als kompliziert heraus, wobei sich die lyophilisierte Form noch besser eignete als der Fertig-Fibrinkleber. In den lyophilisierten Kleber ließen sich die Zellen besser untermischen als in die schon fertig aufgezogenen Spritzen des Tissucol[™] Duo Quick. Im

Tissucol™ Duo Quick war keine gleichmäßige Verteilung der Zellen möglich, da in dieser Fertig-Form die Viskosität zu hoch war. Bei Vorversuchen mit osteogenem Medium alleine stellte sich das Problem des Fibrinkleberschwundes ein. Der Fibrinkleber wurde vorzeitig aufgelöst und weggespült. Dieser schnelle Abbau von Fibrin wurde zum einen verursacht durch Proteasen im zugesetzten FBS, zum anderen durch Proteasen, welche die Chondrozyten freisetzen. Fibrinkleberschwund ist ein bekanntes Problem. Schon eine der ersten Publikationen über das Verhalten von Chondrozyten in Fibrinkleber unter stationären Kultivierungsbedingungen berichtet darüber, dass das Fibringerinnsel ab dem dritten Tag beginnt sich aufzulösen, bis zum siebten Tag vollständig aufgelöst ist und dass die Geschwindigkeit der Degradation abhängig ist von der Zelldichte. Je dichter die Zellen liegen, desto schneller löst sich das Fibrin auf (Homminga et al. 1993). Jedoch kann die vorzeitige Auflösung des Fibrinklebers mit Aprotinin oder Tranexamsäure vermindert werden, und so ein Fibrin-Chondrozyten-Konstrukt über mindestens 4 Wochen hinweg ohne Schrumpfungseffekte kultiviert werden (Meinhart et al. 1999). Aufgrund dessen wurde dem Knorpelmedium während der Differenzierungsphase im Bioreaktor Aprotinin zugesetzt. Bei den ersten Versuchen des vorliegenden Projektes kam es jedoch trotz der Verwendung von Aprotinin zu Formveränderungen. Dieser Effekt konnte jedoch durch eine bessere Positionierung der Schlauchpumpe behoben werden. Ab dem Einsatz des "Allschlauchantriebs" in Kombination mit einem Aluminiumring kam es nur noch zu geringfügigen Formveränderungen. Später in den Folgeuntersuchungen unter Einsatz einer Kunststoffhalterung behielt der Fibrinkleber seine Form ohne Veränderung bei. Den in 1.2.2. gestellten Anforderungen hat Fibrinkleber insgesamt weitgehend entsprochen.

Folgeuntersuchungen

In den Folgeuntersuchungen wurden die gleichen Leitschienen verwendet, es wurde lediglich die Besiedelungsmethode abgeändert (siehe 4.1.2.3.).

4.1.2.3. Besiedelungsmethoden

Die in Kapitel 2.2. beschriebenen Besiedelungsmethoden der beiden Leitschienen und deren Verbindung sollten eine hohe Menge an Zellen innerhalb des Konstruktes bei gleichmäßiger Verteilung gewährleisten. Es war von großer Bedeutung, dass in den Leitschienen hohe Zellkonzentrationen vorherrschen, da die Zelldichte die Mat-

rixproduktion beeinflusst. Bei zu geringer Dichte finden zu wenig interzelluläre Kontakte statt, bei zu hoher Dichte kommt es zu einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten sowie zu einer mangelhaften Versorgungssituation (Holy et al. 2000). Versuche mit Fibrinkleber ohne Zellen in osteochondralen Defekten im Kaninchen-Knie zeigten, dass Fibrinkleber alleine und mit Zusatz von chondrogenen Wachstumsfaktoren eher hinderlich ist für die Zelleinwanderung (Brittberg et al. 1997). Eine hohe Zelldichte bei der Besiedelung beeinflusst die Zellen auch hinsichtlich ihrer Differenzierung. So konnten in tissue-engineertem "Knorpel" mit höherer initialer Chondrozytenzahl deutlich mehr knorpelspezifische Extrazellulärmatrix und insbesondere Kollagen II nachgewiesen werden als in Konstrukten mit niedrigerer initialer Zellzahl (Wang et al. 2006). Auch die Zellverteilung in der Trägermatrix wirkt sich sehr stark auf die Ergebnisse aus. Ausschlaggebend hierfür scheinen Zell-Zellinteraktionen zu sein (Goldstein 2001).

Knochen

Die Besiedelung der knöchernen Leitschiene mit osteoblastenähnlichen Zellen wird in dieser Arbeit mit der Annahme begründet, dass Tutobone[®] durch eine Vorbesiedelung mit humanen Osteoblasten leichter bzw. schneller in den Empfänger Knochen integriert wird. Ob Tutobone[®] ohne Zellen schlechter einwächst als mit Zellen, wurde bislang nicht untersucht. Trotzdem ist diese Annahme nahe liegend, insbesondere in Hinblick auf größere Defektüberbrückungen, bei denen die Zellen erst langsam von den Rändern her einwandern müssten. In der Literatur werden zur Besiedelung von Leitschienen entweder statische oder dynamische Verfahren angewendet. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Beimpfungsmethode ist eine Kombination aus statischer und dynamischer Besiedelung. Nach jeweils 20 Min. Adhärenzphase im Brutschrank wurde das Tutobone[®]-Stück gewendet und die Zellsuspension, die neben der Leitschiene wieder aufgenommen wurde, erneut von oben auf die Leitschiene aufpipettiert. Dadurch sollten die Zellen, die bis dahin noch nicht an der Leitschiene adhärten und sich neben der Leitschiene befanden, nochmals Gelegenheit erhalten, an der bovinen Spongiosa anzuhängen (Stengele 2004). Diese Besiedelungsmethode stellte sich im Vergleich zu anderen Arbeiten als sehr effektiv heraus. Eine Kontrolle der Beimpfungs- Wells nach der Entnahme der besiedelten Leitschienen ergab, dass sich 90 – 92 % der Zellen auf der Leitschiene befanden. In einer neueren Arbeit wurde mit einer dynamischen Beimpfungsmethode eine Beimp-

fungseffizienz von 68 % erreicht (Zhao et al. 2005), in einer anderen Untersuchung mit statischer Besiedlungsmethode sowie einer Adhärenzzeit von einer Stunde lediglich 25 % (Holy et al. 2000). Aufgrund der in den histologischen Auswertungen vorgefundenen dünnen Zellbesiedlung, musste jedoch davon ausgegangen werden, dass sich nicht unerhebliche Anteile der angesiedelten Zellen im Rahmen der dynamischen Kultivierung wieder lösten und das Konstrukt verließen. Daher wurde im Rahmen der Folgeuntersuchungen eine Vorkultivierungsphase der besiedelten knöchernen Leitschiene vorgeschaltet.

Knorpel

Die Besiedlung der Knorpelleitschienen gestaltete sich wie schon in Kap. 4.1.2.2. angedeutet zwar kompliziert, nach anfänglichen Schwierigkeiten konnten jedoch gute Ergebnisse erzielt werden. Die Besiedlung des Fibrinklebers unterlag einem kontinuierlichen Modifikationsprozess, bis eine geeignete Methode gefunden war, die Chondrozyten gleichmäßig einzumischen und den Fibrinkleber zielgenau, gleichmäßig geformt und gut haftend auf die knöchernen Leitschiene aufzutragen. Die Eigenschaften des Fibrinklebers sind dabei von den Konzentrationen der Einzelkomponenten abhängig (Lindner et al. 1980).

Problem Viskosität

Bei den ersten Versuchen wurde die Zelllösung lediglich zusätzlich in die bereits in Spritzen aufgezogenen Fibrinkleber-Komponenten aufgezogen. Durch manuelles Hin- und Herschwenken der Spritzen sollten sich die Chondrozyten im Fibrinkleber verteilen. Aufgrund der relativ hohen Viskosität war diese Strategie jedoch unzureichend. Die Zellen konzentrierten sich an einem Ort, der restliche Fibrinkleber war sehr zellarm bis leer. Beim ersten Versuch der Hauptuntersuchung war die Konzentration des Fibrinklebers an der Stelle, an der sich alle Zellen befanden, so gering, dass diese Stelle nahezu vollständig weggespült wurde, und nur am Rand ein zellfreier Fibrinkleberring übrig blieb (siehe Abb. 11 in Kap. 3.1.). Mit der in Kapitel 2.2.3. beschriebenen Besiedlungsmethode (Einrühren der Zelllösung in die beiden Komponenten auf einem Magnetprüfer bei 37°C) konnte eine gute Verteilung der Zellen im Fibrinkleber erreicht werden. Doch nicht nur eine zu hohe Viskosität bereitet Schwierigkeiten. Wenn die Viskosität zu niedrig ist, wird eine punktgenaue Applikation erschwert und die Fibrinkleber-Zellsuspension dringt zu tief in die knö-

cherne Leitschiene ein, zum anderen kann der Fibrinkleber an den Seiten nach unten laufen. Dadurch könnten unter Umständen die Ein- und Ausgänge der Kammer verstopfen. Hierfür hat sich der Aluminiumring als sehr nützlich erwiesen. Mittels des Aluminiumringes konnte ein seitliches Herablaufen von Fibrinkleber minimiert werden. Wie alle Naturprodukte verhält sich jedoch auch Fibrinkleber nicht immer völlig identisch. Es gibt auch Viskositätsunterschiede innerhalb ein und derselben Charge.

Problem Verfestigungsgeschwindigkeit

Darüber hinaus ist es wichtig, dass sich der Fibrinkleber weder zu schnell noch zu langsam verfestigt, was über die Thrombinkonzentration gesteuert werden kann. Hiervon ist wie auch von der Viskosität des Fibrinklebers und der Porengröße des Tutobone[®] die Eindringtiefe des Fibrinklebers in die Poren der knöchernen Leitschiene abhängig. Gerinnt der Fibrinkleber zu schnell, sitzt er nur relativ instabil auf der Spongiosa oben auf, wodurch der Zusammenhalt der beiden Leitschienekompartimente vermindert wird. Gerinnt der Fibrinkleber zu langsam, durchdringt er die Poren komplett und verdrängt dort möglicherweise die Osteoblasten. Mit der gewählten Thrombinkonzentration ragte der Fibrinkleber ca. 0,5 bis 1,5 mm in die knöcherne Leitschiene hinein, was 17 – 50 % der Höhe der knöchernen Leitschiene entspricht. Zur Untersuchung der mechanischen Stabilität des Knochen-Knorpel-Überganges wurden zwar keine speziellen, objektivierbaren und standardisierten biomechanischen Belastungstests durchgeführt. Beim Zerteilen der Konstrukte mittels Skalpell und Hammer traten jedoch relativ starke Scherkräfte auf. Dabei zeigte sich, ob die Konstrukte an der Knochen-Knorpel-Grenze zusammenhielten oder auseinanderfielen. Letzteres passierte in einem von acht Fällen.

Folgeuntersuchungen

Die Besiedelungsmethode der knöchernen Leitschiene war identisch mit der der Hauptuntersuchungen. Vor der dynamischen Kultivierung im Bioreaktor wurde jedoch eine zweiwöchige Vorkultivierung vorgeschaltet, da postuliert wurde, dass durch eine sofortige Perfusion nach der Besiedelung die osteoblastären Zellen weggeschwemmt werden könnten. Die zweiwöchige statische Vorkultivierung sollte gewährleisten, dass die verwendeten Zellen besser an der Leitschiene anhaften, bevor sie im Perfusionssystem dem Fluss des Mediums ausgesetzt sind. Mit dieser Methode waren in den histologischen Auswertungen höhere Mengen an Zellen innerhalb der Tutobo-

ne[®]-Leitschiene nachweisbar. Bei der Besiedelung der Knorpelleitschiene wurde die Zellverteilung im Fibrinkleber zwar durch die gleiche Technik erwirkt, die Fibrinkleber-Zell-Suspension wurde jedoch zuerst in einer Petrischale in Form von Layern gegossen, nach der Verfestigung kreisrund ausgestanzt und anschließend mit zellfreiem Fibrinkleber auf die Tutobone[®]-Leitschiene aufgeklebt. Dadurch erhielt die knorpelähnliche Komponente eine gleichmäßigere Form und die Chondrozyten konnten bei der Verklebung der beiden Leitschienenkompartimente nicht mehr in die knöcherne Leitschiene einfließen (siehe Kap. 3.6.3. Abb. 27).

4.1.2.4. Bioreaktorsystem

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass es bei der gewählten Leitschiene und Zelldichte unbedingt notwendig ist, in dieses System einen Fibrinolyseinhibitor miteinzubringen, damit sich zum einen der Fibrinkleber nicht auflöst und zum anderen die Chondrozyten nicht mit Osteogenic Supplement in Kontakt kommen. Durch die bessere Trennung der beiden Räume sollten Dedifferenzierungsphänomene theoretisch ausgeschlossen werden. Daraus entstand der Ansatz, das biphasische Konstrukt im oberen und unteren Anteil mit dem jeweils individuell konfigurierten Medium zu perfundieren. Somit war das wichtigste Anforderungskriterium an den Bioreaktor die Gewährleistung einer zeitgleichen Beschickung der Kulturkammer mit zwei verschiedenen Medien. Spinner Flasks und Rotationsbioreaktoren können diese Vorgabe aufgrund ihrer Bauweise nicht erfüllen (Sikavitsas et al. 2002). Möglich war dies im Gradient Container der Fa. Minucells and Minutissue. Die Trennung der beiden Medienkompartimente stellte sich jedoch als schwierig heraus, da sowohl die Kantenundichtigkeit am Rand als auch das Objekt selbst für Shuntvolumina zwischen den beiden Kammerkompartimenten sorgten. Zudem perlten aus dem Medium Gasblasen aus, welche sich entweder im oberen Teil der Kammer sammelten oder in den Silikonschläuchen eine Erhöhung des Flusswiderstandes bewirkten. Befinden sich zu viele Gasblasen in der Kammer, kann es durch Verdrängung im schlechtesten Fall zu einer Unterversorgung des Ko-Konstruktes mit Nährmedium kommen (Minuth et al. 2005, Chalmers 1994). Aufgrund dessen wurden die Kammern täglich auf das Auftreten von Luftblasen hin kontrolliert. Gegebenenfalls wurden die Bläschen durch kurzzeitiges Schräghalten der Kammern entfernt. Zu Beginn der Hauptuntersuchungen war die Schlauchpumpe im abführenden Schlauchschenkel platziert. Es resultierte daraus jedoch eine ungleichmäßige Leerung der beiden Flaschen mit jeweils

frischem Medium. Beim nächsten Versuchsansatz wurde die Schlauchpumpe in die zuführenden Schlauchschenkel eingesetzt, jedoch füllten sich so die beiden Flaschen mit verbrauchtem Medium jeweils ungleichmäßig. Nach Beendigung des ersten Versuchsansatzes war mehr als die Hälfte des Fibrinklebers mitsamt Zellen weggespült. Es ergaben sich Zweifel, ob innerhalb dieser Kammer das jeweilige Medium das jeweils zugedachte Raumkompartiment erreichte. In der Theorie kann dies zu unterschiedlichen Konsequenzen führen.

Defizit an knorpelspezifischem Medium in der Kammer

Sobald über einen längeren Zeitraum hinweg zu wenig knorpelspezifisches Medium in der Kammer ankommt, hat dies für den Fibrinkleber die negative Auswirkung, dass die Aprotinin-Konzentration stark absinkt, somit die Fibrinolyse nicht mehr inhibiert und das Fibrin gespalten wird (Pipan et al. 1992). Folglich löst sich die Leitschiene auf und wird mitsamt Zellen aus der Kammer geschwemmt. Die Erfahrungen aus den Vorversuchen mit osteogenem Medium alleine bestätigen diese Annahme. Ist jedoch nur über einen kürzeren Zeitraum zu wenig knorpelspezifisches Medium in der Kammer und ein Übergewicht an knochenspezifischem Medium vorhanden, so wirkt auf die Chondrozyten das osteogen stimulierende Osteogenic Supplement ein. Ob dies Folgen auf das Differenzierungsverhalten der Chondrozyten haben könnte, wird in Kap. 4.2.4. erörtert.

Defizit an knochenspezifischem Medium in der Kammer

Falls im unteren Teil der Kammer zu wenig knochenspezifisches Medium ankommt, hat das auf die knöchernen Leitschiene keine Folgen. Hypothetisch wäre es möglich, dass diese Situation einen positiven Effekt auf die Fibrinkleberzapfen in den Poren der knöchernen Leitschiene hätte und dadurch Verankerung und Stabilität des Knochen-Knorpel-Überganges sogar besser würden als unter den geplanten Bedingungen. Sobald die POB nur noch wenig oder gar kein knochenspezifisches Medium erreicht, sinkt die Konzentration des Osteogenic Supplement. Hieraus könnte eine schlechtere Differenzierung der Zellen resultieren (siehe Kap. 4.2.4.).

Das Problem der Mediumversorgung konnte verfahrenstechnisch mit dem "Allschlauchantrieb", d.h. mittels Mediumtransport durch Sog und Druck gleichzeitig, gut gelöst werden. Ab dem Zeitpunkt der Einführung dieser Methode trat nur noch

ein deutlich geringerer Fibrinkleberschwund auf. Die chondrozytäre Leitschiene überdauerte die zweiwöchige Differenzierungsphase mit geringeren Formveränderungen. Durch den Einsatz des "Allschlauchantriebes" konnten aber unklare Druckverhältnisse im Inneren der Kammer entstehen. Vorsichtshalber wurden jeden zweiten Tag die Silikonschläuche kurz aus den Schlauchkassetten der Schlauchpumpe genommen, um eventuelle Druckveränderungen zu nivellieren. Dabei muss Druck im Sinne einer Kraffteinwirkung nicht unbedingt negativ bewertet werden. Es ist bekannt, dass osteogene Stimulation nicht allein durch osteogen wirksame Substanzen, sondern auch durch mechanische Stimulation gefördert wird (Bancroft et al. 2003). Bei der Literaturrecherche nach anderen Arten von Bioreaktoren, die eine Ko-Kultivierung von zwei verschiedenen Zellarten unter zeitgleicher Versorgung mit zwei verschiedenen Medien erlauben, fand sich lediglich ein System einer Arbeitsgruppe aus Taiwan. Diese Gruppe entwickelte einen Doppelkammer-Bioreaktor, bestehend aus einem horizontal liegenden Glaszylinder, der mittig von einer senkrecht eingespannten Silikonwand mit Löchern in zwei Teilräume aufgeteilt wird. In die Löcher wiederum werden biphasische Ko-Konstrukte so eingesetzt, dass sie auf der einen Seite z.B. von knorpelspezifischem Medium umspült werden, auf der anderen Seite z.B. von knochenspezifischem Medium. Der Vorteil dieser Bauweise ist, dass mehrere Konstrukte miteinander im gleichen Bioreaktor kultiviert werden können und dass die Konstrukte in ihrer Höhe prinzipiell nicht begrenzt sind, d.h. es wäre beispielsweise theoretisch möglich einen 2 cm langen "Knochen"-Sockel zu generieren. Schwachpunkt an dieser Untersuchung ist, dass keine Kontrollen bzw. Messungen durchgeführt wurden, ob es in diesem Bioreaktor zu einem Mediumaustausch zwischen den beiden Reaktorkompartimenten kommt. Dies bedeutet, dass die Autoren dieser Arbeitsgruppe nicht wissen können, ob es Shuntvolumina zwischen den beiden Reaktorkompartimenten gibt, was anzunehmen ist, und wie groß diese sind. Bislang wurde darüber hinaus von dieser Arbeitsgruppe jedoch nur eine Studie veröffentlicht, in der mit diesem System lediglich Chondrozyten im Gelatinteil einer Gelatin-Kalzium-Phosphat-Leitschiene kultiviert wurden (Chang et al. 2004). Eine Studie mit Chondrozyten und Osteoblasten im Doppelkammer-Bioreaktor wurde noch nicht veröffentlicht.

Folgeuntersuchungen

Im Rahmen der Folgeuntersuchungen kam anstelle des Aluminiumringes eine speziell angefertigte Kunststoffhalterung zum Einsatz (siehe Abb. 9 in Kap. 2.4.), die da-

für sorgen sollte, dass die Shunteffekte in der Kammer durch das Ko-Konstrukt weiter minimiert werden, so dass der "Allschlauchantrieb" nicht mehr nötig wäre. Insbesondere sollten durch eine bessere Trennung der Medien in falsche Richtungen erfolgende Differenzierungseffekte aufgrund des Kontaktes von knochenspezifischem Medium mit Knorpelzellen vermieden werden.

4.1.3. Material und Methoden im Rahmen der Auswertung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend visuell-deskriptive Auswertemethoden verwendet. Die makroskopische und auflichtmikroskopische Beurteilung ist durchaus entscheidend, die Frage nach der Oberflächenbeschaffenheit, der Menge des nach Kultivierung noch vorhandenen Fibrinklebers sowie der Verbindung zwischen den beiden Leitschienen ist grundlegend. Um jedoch die Zelldichte bzw. die Zellmenge und die Morphologie zu beurteilen, müssen sich verschiedene Methoden ergänzen, da eine Methode alleine nicht beide Aspekte gleichzeitig darstellen kann. Daher erfolgten sowohl eine HE-Färbung nach Anfertigung von Kryoschnitten zur Abschätzung der Quantität wie auch eine MMA-Einbettung zur verbesserten Darstellung der Morphologie der Zellstruktur. Die Fragen nach Art und Funktion der Zellen sollten durch immunhistochemische Markierungen beantwortet werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Makroskopische Betrachtung

Nach zweiwöchiger Kultivierung im Bioreaktor zeigte sich beim ersten Versuchsansatz zunächst ein ungenügendes Ergebnis hinsichtlich des verbliebenen Fibrinklebers. Zentral war die Knorpelleitschiene weggespült, peripher blieb noch ein schmaler Ring erhalten. Die Ursachen hierfür wurden in der Besiedelung der Knorpelleitschiene sowie im Bioreaktor gesucht. Nach der ersten Optimierung des Versuchsaufbaus war der Fibrinkleber dann zwar noch erhalten, jedoch verformt. Unter den zuletzt etablierten Bedingungen wurden jedoch relativ gleichmäßig geformte Konstrukte generiert. Vom morphologischen Aspekt her waren die Ko-Konstrukte beispielsweise mit Elementen aus osteochondralen Mosaikplastiken vergleichbar. Die Proportionen zwischen den beiden Teilen waren jedoch noch ein wenig verbes-

serungswürdig, da der Knorpelteil im Vergleich zum Knorpelüberzug in einem Kniegelenk vergleichsweise dick geraten ist. Ein relativ flacher knöcherner Anteil würde eine Verankerung im Empfängerknochen sicherlich erschweren.

4.2.2. Auflichtmikroskopische Betrachtung

In der auflichtmikroskopischen Betrachtung war der Übergang zwischen den beiden Leitschienen gut einsehbar. Er stellte sich nahtlos und fest verbunden dar. Abgesehen vom ersten Versuchsansatz erschien bei allen weiteren Untersuchungen die gallertige Masse des Fibrinklebers kompakt, es zeigten sich keine großen Hohlräume innerhalb des Fibrinklebers, was daraus schließen lässt, dass während der Kultivierung im Bioreaktor auch in der Mitte des Fibrinklebers genügend Fibrinolyseinhibition erfolgte.

4.2.3. Histologische Auswertung

In den HE-gefärbten Kryoschnitten zeigten sich innerhalb der knöchernen Leitschiene ausreichende Zellmengen. Die Zelldichte fiel im Vergleich zur Etablierung der Besiedelungsmethode etwas schlechter aus (Stengele 2004). Ein Erklärungsansatz hierfür war, dass die Zellen nach der 2-stündigen Besiedelungsphase doch noch nicht ausreichend adhärent an der Leitschiene anhafteten wie erwartet und nach Beginn der Perfusion weggespült wurden (siehe Kap. 4.3.). Auch die Zellverteilung war kritisch gesehen ungleichmäßig, in jedem Ko-Konstrukt waren jedoch auch in der Mitte der knöchernen Leitschiene Zellen vorhanden. Eine ungleichmäßige Zellverteilung könnte die Proliferation negativ beeinflussen, würde sich aber auf die Differenzierung eher positiv auswirken (Goldstein 2001). Darüber hinaus war in den Kryoschnitten auffällig, dass der Fibrinkleber mit den Chondrozyten sehr weit (bis zu 1,5 mm bzw. 50 % der Gesamthöhe der knöchernen Leitschiene) in die Poren des Tutobone[®] hineinragte. Das Einfließen von Fibrinkleber mit Chondrozyten in die knöchernen Leitschiene könnte negative als auch positive Effekte nach sich ziehen. Als negativ zu werten wäre eine Verdrängung der Osteoblasten, als positiv ein gewisses Ausmaß an Ineinanderwachsen der beiden Teile zur Generierung eines einer subchondralen Platte ähnlichen Gewebes. Innerhalb des Fibrinklebers, der aufgrund seiner Netzstruktur nach Kryoschnitt Blasenartefakte erzeugte, befanden sich viele runde Zellen, die mengenmäßig mit histologischen Schnitten von hyalinem Knorpel

vergleichbar waren. Die Zellanordnung war relativ gleichmäßig, es waren bei den modifizierten Versuchsansätzen weder zellfreie Areale noch Zellcluster zu finden. Teilweise lagen die Chondrozyten paarweise vor, vom Aspekt her vergleichbar mit Chondronen. Hieraus lässt sich schließen, dass während der zweiwöchigen Ko-Kultivierungsphase noch Zellteilungen stattgefunden haben und dass gute Bedingungen hinsichtlich Zellteilung und Zellproliferation gegeben waren.

In den MMA-Einbettungen konnte die Histomorphologie aufgrund der Vermeidung von Artefaktbildungen besser beurteilt werden. Es zeigten sich Anordnungen von POB in Form von Strängen, die die Tutobone[®]-Bälkchen miteinander in Verbindung setzten. Die Anordnung ähnelte dabei den Spongiosatrabekeln so sehr, dass dies der Beginn des Neuaufbaus eines Knochentrabekels zu sein scheint. Der Fibrinkleber kommt in den MMA-Schnitten sehr gleichmäßig und ohne visuell störende Blasenartefakte zur Darstellung. Im Fibrin erscheinen die Chondrozyten ebenso wie schon in den Kryoschnitten gleichmäßig verteilt. Der Übergang von der Knochen-Leitschiene zur Knorpel-Leitschiene stellt sich jedoch nur in Form eines Aufeinandertreffens der beiden Leitschienen dar. Es wurde insbesondere kein Ineinanderwachsen ähnlich einer subchondralen Platte beobachtet. Die Zellen besitzen keine spezielle Ausrichtung wie in originärem hyalinen Knorpel *in vivo*, insbesondere keine säulenartige Anordnung. Bessere Ergebnisse erzielte dahingehend eine andere Arbeit, die beim Tissue Engineering in Form menschlicher Fingerglieder mit kleinen Gelenken beim Knochen-Knorpel-Übergang dem Aspekt einer subchondralen Platte nahe kam. Charakteristisch hierfür war die Anordnung der Chondrozyten in ruhende, proliferierende und hypertrophe Zellen, die in Richtung Knochenteil in parallelen Säulen geordnet vorlagen. Allerdings sind die Ergebnisse mit unseren nicht vergleichbar, da die Konstrukte jeweils heterotop in athyme Nacktmäuse implantiert und anschließend 30 – 60 Wochen lang *in vivo* kultiviert wurden (Landis et al. 2005). Es wäre durchaus möglich, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ko-Konstrukte nach einer 60-wöchigen *in vivo*-Kultivierung ebenso Gewebe bilden, das einer subchondralen Platte gleicht.

4.2.4. Immunhistochemische Markierungen

Mittels immunhistochemischer Markierungen sollten Fragen bezüglich der Zellfunktion, der Differenzierung sowie der Zellvitalität beantwortet werden. Bei positiven Markierungen ist davon auszugehen, dass die Zellen bis zur Fixierung vital waren und in

der Lage, zellarttypische Proteine zu produzieren. Es ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass die Zellen schon beim Besiedelungsvorgang abgestorben sind, die Matrixprodukte jedoch trotzdem nachweisbar sind. Gegen einen vorzeitigen Zelltod spricht jedoch eindeutig die Konstellation der Osteoblasten in Form von Trabekeln (siehe Kap. 4.2.3) sowie das paarweise Auftreten von Chondrozyten, da dies als Hinweis darauf zu werten ist, dass zumindest noch Zellteilungen in diesem System stattgefunden haben. Wie in den Abbildungen und Übersichtstabellen im Ergebnisteil dargestellt (siehe Kap. 3.4.1.), fallen die immunhistochemischen Markierungen sehr unterschiedlich aus, teils wie erwartet, teils unerwartet. Die Abbildungen wurden exemplarisch ausgewählt, d.h. der Informationsgehalt erhöht sich infolge der Darstellung mehrerer Abbildungen identisch beurteilter Markierungsergebnisse bei verschiedenen Markern nicht.

Knochenkompartiment:

Knochentypische Marker:

Der Nachweis der Knochenzell-typischen Marker Kollagen Typ I und Osteocalcin war innerhalb der knöchernen Leitschiene erwartungsgemäß stark positiv. Daran und an der positiven Markierung von Osteonectin sowie der schwach positiven Markierung von Osteopontin lässt sich eine Differenzierung der Zellen in Richtung osteoblastärer Differenzierungskaskade belegen. Somit wurde von den Zellen Extrazellulärmatrix in Form von Kollagenfasern gebildet. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Studien, insbesondere mit einem Versuchsansatz mit BMSC von Ziegen auf Hydroxylapatit-Chitosan-Leitschienen, bei dem der Nachweis von Kollagen Typ I und Osteopontin ebenfalls positiv war (Oliveira et al. 2006). Die Markierung von Bonesialoprotein gelang in nur zwei von sieben Ko-Konstrukten.

Knorpeltypische Marker:

Wie erwartet war im Knochenteil das für hyalinen Knorpel typische Kollagen II, ebenso wie Kollagen IX nicht nachweisbar. Die positive Markierung von Glykosaminoglykan (GAG) ist mit der physiologischen Eigenschaft erklärbar, dass auch Osteoblasten in gewissen Mengen Glykosaminoglykane produzieren (Takagi et al. 1983). Somit sind Glykosaminoglykane nicht so spezifisch für Knorpel wie beispielsweise Kollagen II und IX. Dass allerdings in den meisten Fällen die Markierungen von GAG innerhalb einer Ko-Kultur im Chondrozyten- und im Osteoblastenteil die gleiche In-

tensität aufwies, ist bemerkenswert. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Zellen, die innerhalb der Tutobone[®]-Poren markiert wurden gar keine Osteoblasten waren, sondern Chondrozyten am falschen Ort. Methodisch bedingt befanden sich im Fibrinkleber nur Chondrozyten, in der knöchernen Leitschiene jedoch konnten sich sowohl POB als auch PCH befinden, da der Fibrinkleber zu einem gewissen Anteil in die Poren der bovinen Spongiosa eingedrungen war.

Knorpelkompartiment:

Knorpeltypische Marker:

Bei der Markierung mit Kollagen II-Antikörpern konnte in keinem der kultivierten Ko-Konstrukte Kollagen II nachgewiesen werden. Auch bei Kollagen IX gelang die positive Markierung in nur einem Fall, zwei waren schwach positiv und vier Ko-Kulturen negativ. Am ehesten sind Dedifferenzierungsphänomene hierfür ursächlich, genauer betrachtet war entweder die Proliferationsphase in 2D-Kultur zu lange oder die Differenzierungsphase im Bioreaktor zu kurz. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse anderer Autoren gestützt (Jakob et al. 2001, Benya et al. 1982, von der Mark et al. 1977). Aufgrund der Tatsache, dass Chondrozyten in Langzeitkultur ihre Fähigkeit Kollagen II zu produzieren verlieren und stattdessen nur noch Kollagen I synthetisieren, lässt sich die Dedifferenzierung besonders gut belegen (Rodriguez et al. 1998). Eine andere Ursache könnte aber auch das Fehlen eines chondrogenen Differenzierungszusatzes sein. Unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, dass in der Explantkultur keine Chondrozyten, sondern Fibroblasten gewonnen wurden, die in den Zellkulturflaschen phasenkontrastmikroskopisch nicht von Chondrozyten zu unterscheiden sind (Grundmann et al. 1980). Dagegen sprechen jedoch immunhistochemische Markierungen der Chondrozyten in Voruntersuchungen, in denen Kollagen Typ II nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt). Wie erwartet fielen die Glykosaminoglykanmarkierungen innerhalb der Knorpel-Leitschiene positiv aus. Über den Nachweis von GAG lässt sich zeigen, dass auch in einem System in dem keine chondrogenen Differenzierungsfaktoren zugesetzt wurden, trotzdem knorpeltypische Proteine gebildet werden können. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch eine australische Arbeitsgruppe. Zwar sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar, da hier humane fötale Osteoblasten und Chondrozyten verwendet wurden im Gegensatz zu adulten Zellen wie in vorliegender Arbeit. Aber auch in dieser Studie zeigte sich, dass in einem System ohne chondrogenen Differenzierungs-

zusatz die GAG-Werte deutlich positiv waren. Innerhalb der Studie wurde tissue-engineerter Knorpel alleine mit Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukten verglichen. Die osteochondralen Konstrukte schnitten bezüglich der GAG-Konzentration besser ab (Mahmoudifar et al. 2005).

Knochentypische Marker:

Dass die Markierungen von Kollagen I im Knorpelteil positiv waren, ist in Hinsicht auf die Qualität des hergestellten Gewebes eher als negativ zu werten, da hyaliner Knorpel gewöhnlich nur Spuren von Kollagen I enthält. Nur in Faserknorpel und minderwertigem Narbengewebe ist diese Kollagenart in größeren Mengen enthalten. Überraschenderweise fiel die Markierung mit Osteocalcin auch bei den Chondrozyten positiv aus. Ebenso positiv fielen die Markierungen von Osteonectin und Osteopontin aus, wobei diese beiden Bestandteile auch in vielen anderen Geweben vorkommen, wie beispielsweise in Zellen, die sich von glatter Muskulatur ableiten (Mastrogiacomo et al. 2005). Bonesialoprotein ließ sich nicht darstellen. Weshalb Chondrozyten in diesem System Osteocalcin exprimierten, kann unterschiedlich erklärt werden. Ein Artefakt im Sinne eines Färbefehlers durch Markierung von Osteoblasten ist unwahrscheinlich bis nahezu ausgeschlossen. Im Bereich der Knorpelleit-schiene können nur PCH liegen, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass ein Osteoblast in 2 Wochen 2 - 4 mm in den Fibrinkleber einwandert. Prinzipiell wäre auch die Erklärung möglich, dass die falsche Zellart isoliert und proliferiert wurde. Jedoch ist es bei der Bearbeitung des Nasenseptums deutlich sicht- und spürbar, wo sich Knorpel- und Knochenanteile befinden. Dementsprechend wurden auch nur Knorpelstückchen in die Zellkulturflaschen überführt. Am wahrscheinlichsten ist die Ursache auch hier ein Dedifferenzierungseffekt. Nach der Isolierung aus der gewebespezifischen Matrix adhären die Zellen am Boden der Kulturgefäße, wachsen und teilen sich, bis die Zellschicht den Zustand der Konfluenz erreicht hat. Dabei verlieren die Zellen jedoch ihre typische Morphologie wie auch ihre biochemischen und funktionellen Eigenschaften (Minuth et al. 2005). Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre der Übergang in eine andere Zelllinie. Die Differenzierung in Richtung der osteoblastären Zellreihe läuft nicht streng in eine Richtung ab. Physiologischerweise kommt es sowohl zu Dedifferenzierungsprozessen wie auch zu Übergängen in andere Zelllinien z.B. von Skelettmuskelzellen zur osteoblastären Differenzierungskaskade (Mastrogiacomo et al. 2005). Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass sich die

Chondrozyten bereits hin zu hypertrophen Chondrozyten entwickelten und deshalb Osteocalcin bildeten (Lian et al. 1993). Eine neuere molekulargenetische Untersuchung zeigte, dass mit einer Inhibition des p38-Signalwegs die Osteocalcin-Expression in Chondrozyten erhöht werden kann (Stanton et al. 2007). Die Ursache könnte aber auch in einem Mediaustausch zwischen den beiden Kammerkompartimenten liegen. Falls die Chondrozyten mit dem Osteogenic Supplement des anderen Mediumraumes in Kontakt kamen, wäre dies durchaus denkbar. Eine Studie mit hBMSC, in der die Zellen einerseits mit chondrogenem andererseits mit osteogenem Differenzierungszusatz stimuliert wurden, liefert ebenso Hinweise für diese Erklärung (Marolt et al. 2006). Das Nicht-Vorhandensein chondrogener Differenzierungszusätze stellt eine weitere mögliche Ursache dar. Doch nicht nur Substanzen wie TGF- β können die chondrogene Differenzierung in Gang setzen, sondern auch Ultraschallwellen mit niedriger Intensität (low intensity ultra sound = LIUS) oder allein die Anordnung in einer dreidimensionalen Umgebung (Lee et al. 2006, Jakob et al. 2001). Die Ursache für eine Osteocalcin-Expression der Chondrozyten könnte auch in einer parakrinen Wirkung von Osteoblasten auf Chondrozyten begründet liegen. In einer Studie, in der Wechselwirkungen der beiden Zellarten auf die Differenzierung und den Phänotyp der jeweils anderen Art nachgewiesen wurden, waren allerdings keine erhöhten Osteocalcin-Spiegel in Chondrozyten messbar (Nakaoka et al. 2006, Jiang et al. 2005). Weitere Untersuchungen zur Wirkung von Osteogenic Supplement auf chondrozytäre Zellen wären erforderlich.

4.2.5. Rasterelektronenmikroskopische Auswertung

Anhand des dreidimensionalen Wachstums der Osteoblasten in Form eines Mehrfach-Layers lässt sich eine gute Integration der Zellen in die knöchernen Leitschiene ableiten. In einem gut erhaltenen Fibrinkleber-Netz zeigen sich Zelllücken in der Größe von Chondrozyten. Aufgrund der passenden Größe ist anzunehmen, dass ein Chondrozyt diesen Abdruck hinterlassen hat und dies nicht nur Luftblasenartefakte sind. Soweit mit dieser Methode beurteilbar, ergab sich kein Anhalt für eine innere Degradation des Fibrins. Kritisch beurteilt werden muss hingegen die Menge der Zellen. Es waren bei der Durchsicht der Ko-Konstrukte nur sehr wenig Zellen an den gefriergebrochenen Flächen zu finden. Ob das nur daran lag, dass ungünstige Bruchstellen getroffen wurden oder ob tatsächlich relativ wenige Zellen vorhanden waren, lässt sich mit dieser Methode nicht beurteilen.

4.3. Vergleich mit Folgeuntersuchungen

Im Rahmen der Folgeuntersuchungen konnten noch bestehende Schwachpunkte der Hauptuntersuchungen optimiert werden. Die Ortsstabilität der Zellen wurde zunächst durch verschiedene Maßnahmen verbessert. Einen deutlichen Effekt hatte die zweiwöchige Vorkultivierung der knöchernen Leitschienen mit hMSC auf die Zelldichte innerhalb der vorbestehenden Trabekel. Hier zeigte sich in den histologischen Auswertungen eine größere Menge an Zellen aufgrund der verbesserten primären Adhärenz. Die Knorpelleitschienen konnten durch das Gießen von Layern in Petrischalen in eine definierte Form gebracht werden. Zusätzlich hatte dies den Effekt, dass die Chondrozyten nur innerhalb der Knorpelleitschiene zu finden waren und nicht auch in der knöchernen Leitschiene. Die Wirkung der Kunststoffhalterung, eingesetzt zur verbesserten Trennung der beiden Medienkompartimente, konnte am Auftreten von Shunteffekten in der Kammer eingeschätzt werden. Da davon ausgegangen wurde, dass die Kunststoffhalterung besser abdichtet als der Aluminiumring, wurden die Ko-Kulturen zuerst ohne "Allschlauchantrieb" in Betrieb genommen und auf die gleichmäßige Füllung der Abfallflaschen geachtet. Sobald diese sich ungleichmäßig füllten, musste die Ursache ein neu aufgetretener Shunteffekt sein. In diesem Falle wurde wiederum auf den "Allschlauchantrieb" übergegangen. Bei den 2-Wochen-Ko-Kulturen war dies bei einer von drei Kammern nach 3 Tagen erforderlich, bei den 6-Wochen-Ko-Kulturen trat ebenso in einer von drei Kammern ein Shunt auf, jedoch erst nach 2 Wochen Kultivierung. Es konnte somit festgestellt werden, dass insgesamt eine bessere Trennung der beiden Medienräume erreicht wurde und damit eine zuverlässigere Trasyloiwirkung. Belegt wird diese Feststellung insbesondere durch die besseren makroskopischen Ergebnisse. Bezüglich der immunhistochemischen Ergebnisse kam es jedoch interessanterweise ebenfalls zu einem positiven Osteocalcinnachweis innerhalb der Knorpel-Leitschiene. Aufgrund dieses Ergebnisses muss die Hypothese verworfen werden, dass die Kunststoffhalterung zu einer vollständigen Trennung der beiden Medienkompartimente bzw. zur Vermeidung des Kontaktes von Knorpelzellen mit Osteogenic Supplement und somit zur Vermeidung von Dedifferenzierungsphänomenen bzw. von Übergängen in andere Zelllinien geführt hat. Bezüglich der Kollagen II – Synthese schnitten die optimierten Ko-Kulturen geringfügig besser ab als die vorhergehenden.

4.4. Zusammenfassende Beurteilung

4.4.1. Besondere Aspekte hinsichtlich des klinischen Einsatzes

Es dauert relativ lange und es ist mit vergleichsweise viel Aufwand verbunden, ein osteochondrales Ko-Konstrukt zu generieren. Für die Geweberekonstruktion mittels tissue-engineerten Konstrukten müssen darüber hinaus eine Reihe weiterer Aspekte berücksichtigt werden. Eines der Hauptprobleme ist zunächst die Bereitstellung ausreichender Zellmengen zur Züchtung eines Transplantates in der gewünschten Dimension. So werden nach den Vorgaben im Rahmen der vorliegenden Arbeit mindestens 4,4 Mio. Zellen pro 1 cm³ Knorpelgewebe benötigt. Während der eigentlichen Geweberekonstruktion kommt es darauf an, die erforderliche Form des Transplantates weitgehend abzubilden und den Zellverlust möglichst gering zu halten. Insbesondere beim Passagieren sollten Zellverluste vermieden werden. Sie entstehen beispielsweise durch zu aggressive Enzymbehandlung und durch Zellverklumpungen. Die Zeit für die Proliferation der Zellen vor Ansatz der dynamischen Ko-Kultivierung beträgt bestenfalls 8 Wochen, eher 10-12 Wochen, abhängig davon wie viele Zellen initial gewonnen wurden. Für Patienten mit einem degenerativen Knorpeldefekt spielt diese Zeit jedoch keine so große Rolle, da ein chronisches Problem vorliegt, was in der Regel nicht innerhalb kurzer Zeit gelöst werden muss. Auch ist eine solche Therapie nicht kostengünstig. Sie ist vergleichsweise zeitintensiv, erfordert sehr hohe Standards hinsichtlich Labortechnik etc. sowie gut ausgebildetes Personal (Lindl 2002, Freshney 1990). Davon abgesehen sind auch die Materialkosten nicht gering. Außerdem sollte während der ganzen Zeitspanne der *in vitro* Kultivierung nur autologes Serum vom jeweiligen Patienten verwendet werden, um virale Infektionen oder Immunreaktionen auf fremde Antigene auszuschließen (Sittinger et al. 1996). Dabei muss der Bedarf an autologem Serum für die gesamte Zellkultur abgeschätzt werden. Beispielsweise werden zur Züchtung eines Objektes in der Größe einer Ohrmuschel aus Zellen des Nasenseptums nach bisherigen Erfahrungen ca. 1500 ml Patientenblut zur Gewinnung der erforderlichen Menge an autologem Serum benötigt (Sittinger 1997). Eine weitere Möglichkeit die genannten Risiken so gering wie möglich zu halten wäre die Verwendung von autologem Fibrinkleber. Wittenzellner et al. entwickelten eine Methode, die ein einfach durchzuführendes und effizientes Verfahren zur effizienten Gewinnung von zellverträglichem autologem Fibrinkle-

ber darstellt (Wittenzellner et al. 2005).

4.4.2. Potentielle Problemstellungen

Letztendlich ist ein osteochondrales Konstrukt ein Produkt, das in einem Produktionsprozess in vielen Einzelschritten hergestellt wird, welche alle eine gewisse Störanfälligkeit aufweisen. Die bovine Spongiosa beispielsweise unterscheidet sich hinsichtlich der Porösität nicht wenig von Charge zu Charge. Wenn das zu verarbeitende Stück sehr nah an der Kompakta entnommen wurde, können die Poren relativ klein sein und so die Besiedelung und die Durchbauung mit Zellen beeinträchtigen. Daher müssen die knöchernen Leitschienen genau besehen und nach geeigneter Porengröße ausgewählt werden. Es könnten weiterhin beispielsweise die falschen Zellen isoliert, und Fibroblasten statt Chondrozyten proliferiert werden. Dies ist gar nicht so unwahrscheinlich, da die Chondrozyten in den Kulturbedingungen zunächst so weit dedifferenzieren, dass sie eine fibroblastenähnliche Form annehmen und sich dann teilen (Grundmann et al. 1980). Dies könnte verhindert werden, indem die Zellen in 2D-Kultur immunhistochemisch markiert und damit identifiziert und ausgewählt werden. Ein weiteres und sehr kritisches Problem ist die Verkeimung trotz Antibiotika-Zusatz im Medium. Beginnend mit der Entnahme der Gewebeprobe bis hin zur Transplantation des gezüchteten Gewebes liegen viele Teilschritte, bei denen das Risiko einer Verkeimung der Kulturen jeweils durch geeignete Maßnahmen möglichst gering gehalten werden muss. Dazu müssen strengste Hygiene-Richtlinien beachtet werden. Besonders problematisch sind Mycoplasmen-Kontaminationen, da diese unter Verwendung konventioneller Mikroskopie nicht sichtbar sind und sich somit der laufenden visuellen Kontrolle entziehen. Eine Mycoplasmen-Kontamination kann während einer längerdauernden Kultur auftreten, diese Bakterien können aber auch schon im Spendermaterial enthalten sein (Wirth et al. 1994). Deshalb ist es erforderlich, die Primärkulturen frühzeitig auf Mycoplasmen zu testen.

4.4.3. Einschränkungen

Dadurch, dass es nicht möglich war, auch nicht in den Folgeuntersuchungen, die beiden Medienräume dicht voneinander zu trennen, entstanden unklare Wechselbeziehungen zwischen Medien, Zellen und Leitschienen. Eine vollständige Trennung der beiden Medienkompartimente scheint jedoch aufgrund der Struktur des Ko-

Konstruktes nicht möglich. Mit Material, das zwar passgenau in eine Aussparung zwischen zwei Räumen passt, jedoch Diffusion erlaubt, können zwei Räume nicht wasserdicht voneinander getrennt werden. Aufgrund dessen darf in den vorliegenden Versuchsansätzen letztlich keine vollständige Trennung erwartet werden. Ein weiteres Problem, das beim Tissue Engineering grundsätzlich nicht unbeachtet bleiben darf, ist, dass eine eventuelle neoplastische Transformation *in vitro* keiner Kontrolle durch ein Immunsystem unterliegt. In einer Studie mit murinen BMSC zeigten diese Zellen nach zahlreichen Passagen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, wobei die Zellen maligne transformierten und nach Implantation *in vivo* Fibrosarkome bildeten (Miura et al. 2006). Auch ist eine Immunreaktion nach Implantation von tissue-engineerten Konstrukten mit autologen Zellen nicht vollständig auszuschließen. Es wäre denkbar, dass der Empfängerorganismus auf Reste von FBS oder auf den Fibrinkleber reagiert. Um dieses Risiko so gering wie möglich zu halten, könnte beispielsweise aber das aus patienteneigenem Serum gewonnene Fibrin und Thrombin als Fibrinkleber verwendet werden (Haisch et al. 2000). Zur Kultivierung und Proliferation der Zellen könnte statt FBS entweder autologes Serum oder serumfreies Medium unter Zusatz von Wachstumsfaktoren zur Anwendung kommen (Kamil et al. 2007). Ein weiterer kritischer Punkt ist die Defektgröße. Bislang konnten nur relativ kleine Konstrukte generiert werden. Limitierender Faktor ist die Nährstoffversorgung über Diffusion. Eine mögliche Lösung wäre, Konstrukte mit Gefäßen zu generieren (Tischer et al. 2004). Letztlich sind die osteochondralen Defekte, die zu behandeln sind, nicht kreisrund oder quadratisch. Es wird unter Umständen nötig sein, Leitschienen in genau der Form des Defektes herzustellen. Zukunftsweisend ist dahingehend das Fused Deposition Modeling (FDM) oder auch das Rapid Prototyping (RP). Letzteres sind Techniken, mit denen mittels eines 3D-Druckers Leitschienen hergestellt werden, indem Pulverschichten aufgetragen werden, die kontrolliert durch einen Verbundstoff fixiert werden. Dabei liefern Daten aus CT-Aufnahmen am Patienten die Informationen an den Drucker, in welcher Form die Leitschiene gedruckt werden soll (Leukers et al. 2005, Hutmacher et al. 2001). Trotz aller Forschungsanstrengungen kann es dennoch sein, dass die Qualität einer autologen osteochondralen Transplantation nicht erreicht wird. Eine erst vor kurzem veröffentlichte Studie sagt zumindest aus, dass autogene osteochondrale Transplantate in einem Defekt in Kniegelenken von Zwergschweinen nach wie vor deutlich bessere Ergebnisse erzielen als tissue-engineerte Implantate (Chang et al. 2006). Methodisch kritisch ist bei

dieser Untersuchung allerdings, dass für das Tissue Engineering dieser osteochondralen Ersatzstücke allogene Zellen verwendet wurden.

4.5. Klinische Relevanz und Ausblick

Neuartig im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die neue Kombination an Leitschienen, die mit Patienten-Zellen besiedelt wurden. Dies ist einer klinischen Anwendung im Vergleich zu anderen Arbeiten auf diesem Gebiet vergleichsweise nahe, welche meist entweder mit tierischen Zellen, nur mit einer Zellart oder mit kommerziell erworbenen Zelllinien und nicht mit Chondrozyten und Osteoblasten oder mit Trägermaterialien arbeiten, welche für die klinische Anwendung noch nicht zugelassen sind. Ein neuartiger Ansatz ist auch, solch ein Objekt zeitgleich mit zwei verschiedenen Medien in dem von Minuth entwickelten Bioreaktor zu kultivieren, welcher sich relativ gut eignet (Minuth et al. 1992). Es ist also möglich, ein biphasisches osteochondrales Konstrukt entweder mit zwei verschiedenen Zellarten oder mit einer Zellart, dafür aber mit zwei verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Differenzierungszusätzen zu versorgen, oder aber beides miteinander zu kombinieren. Die Probleme, die dieser Bioreaktor in Hinblick auf die Trennung der beiden Medienräume mit sich brachte, kann vermutlich kein anderes System besser lösen, da das Konstrukt an sich auch bei völlig dichter Umschließung nach wie vor eine undichte Stelle bilden würde. Moderne Computertechnologie hält auch auf dem Gebiet des Tissue Engineering Einzug. Es werden sich in Zukunft in die interdisziplinären Arbeitsgruppen aus Medizinern, Biologen, Bioingenieuren, Verfahrenstechnikern, Tiermedizinern und Chemikern sicher auch Informatiker und Biomathematiker einreihen. Computergestützte Verfahren, auch CATE (Computer Aided Tissue Engineering) genannt, gewinnen beim Tissue Engineering zunehmend größere Bedeutung (Sun et al. 2004). Diese Verfahren zielen nicht nur darauf ab, patientengerechte Konstrukte herzustellen, sondern auch darauf, dass dies in einer effizienten Art und Weise möglich ist, beispielsweise durch die gleichzeitige Kultivierung von vielen kleinen Konstrukten in einem größeren Bioreaktor (Dvir et al. 2006).

5. Zusammenfassung

Zielsetzung und Fragestellung:

Die Therapie osteochondraler Defekte ist nach wie vor eine große Herausforderung. Tissue Engineering kann hierfür neue Lösungsansätze bieten. Ein Ansatz ist die Ko-Kultivierung von autologen Osteoblasten und Chondrozyten in einer dreidimensionalen biphasischen Leitschiene zur Generierung osteochondraler Implantate. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in Explantkultur gewonnene humane Osteoblasten und Chondrozyten auf Leitschienen kultiviert werden, die bereits für die klinische Anwendung zugelassen sind. Als Leitschienen wurden bovine Spongiosa (Tutobone[®], Fa. Tutogen Medical, Neunkirchen, D) und Fibrinkleber (Tissucol[™], Fa. Baxter, München, D) verwendet. Ziel der Arbeit war zunächst die Etablierung eines Bioreaktorsystems, mit dem zwei verschiedene Zelltypen, osteoblastäre und chondroblastäre Zellen, innerhalb einer biphasischen Leitschiene zeitgleich, aber getrennt voneinander mit zwei verschiedenen Nährmedien versorgt werden können. Die Knochen-Knorpel-Ko-Konstrukte sollten über einen Zeitraum von 2 Wochen dynamisch kultiviert und währenddessen die osteoblastären Zellen osteogen stimuliert werden. Die Beurteilung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung erfolgte mittels histologischer, immunhistochemischer und rasterelektronenmikroskopischer Auswertungen. In Folgeuntersuchungen wurden die Trennung der beiden Medienkompartimente sowie die Ortsstabilität der osteoblastären Zellen und die Formstabilität der Knorpel-Leitschiene optimiert und Langzeitkultivierungen über 6 Wochen durchgeführt.

Material und Methoden:

Humane osteoblastäre Zellen wurden mittels Explantkultur aus Mittelfußknochen gewonnen und 8 – 12 Wochen in 2D-Kultur proliferiert. Humane Chondrozyten wurden analog dazu aus der Lamina perpendicularis von Nasensepten gewonnen. Die knöchernen Leitschiene (Tutobone[®]) wurde mit 1×10^6 humanen osteoblastären Zellen in den Hauptuntersuchungen bzw. humanen Mesenchymalen Stammzellen in den Folgeuntersuchungen besiedelt. Die humanen Chondrozyten wurden in Fibrinkleber suspendiert und in einer Anzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen auf die knöchernen Leitschiene als Knorpelüberschichtung aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte für 2 Wochen in einem Bioreaktor (Gradient Container, Fa. Minucells and Minutissue, Bad Abbach, D)

bei getrennter kontinuierlicher Mediumversorgung (2 x 1,0 ml/h). Dem knochenspezifischen Medium wurde Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -Glycerophosphat zur osteogenen Stimulation hinzugefügt. Um den Fibrinkleber vor einer vorzeitigen Degradation zu bewahren wurde dem knorpelspezifischen Medium ein Fibrinolyseinhibitor (Trasylo) beigefügt. Zur verbesserten Trennung der beiden Mediumkompartimente wurden zunächst ein Aluminiumring und ein so genannter "Allschlauchantrieb" als Mediumtransportsystem eingeführt. In den Folgeuntersuchungen wurden eine speziell angefertigte Kunststoffhalterung, die Vorkultivierung zur verbesserten Ortsstabilität der Zellen und das Vorgießen von Knorpelzell-Fibrinkleber-Layern zur verbesserten Formgebung der Knorpel-Leitschiene etabliert. Nach 2 bzw. 6 Wochen wurden die Ko-Kulturen auflichtmikroskopisch, histologisch, immunhistochemisch und rasterelektronenmikroskopisch ausgewertet. Die Ko-Kulturansätze wurden insgesamt 14 mal durchgeführt.

Ergebnisse:

Die makroskopische Betrachtung zeigte Konstrukte mit Adhäsion des Fibrinklebers an der Spongiosa, wobei sich die Form der Fibrinkleber-Leitschienen in den ersten Versuchsansätzen noch veränderte. Nach Etablierung der verschiedenen Maßnahmen zur verbesserten Trennung der Medienkompartimente war der Fibrinkleber in seiner ursprünglichen Form konstant und wurde kaum mehr vorzeitig abgebaut. Dreidimensionales Zellwachstum von Osteoblasten bzw. hMSC und Chondrozyten konnte mittels histologischer und rasterelektronenmikroskopischer Auswertung in jeweils beiden Kompartimenten, in den Folgeuntersuchungen bei zunehmender Qualität und Quantität, nachgewiesen werden. Wie erwartet waren die immunhistochemischen Nachweise für Kollagen I, Osteocalcin und Osteonectin innerhalb der Knochenkompartimente der Ko-Kulturen positiv, innerhalb der Knorpelleitschiene waren die Nachweise für Glykosaminoglykan 3B3+Abc und 2B6+Abc positiv. Überraschenderweise markierten die Chondrozyten beim Osteocalcinnachweis deutlich positiv, auch in den Folgeuntersuchungen. Der Nachweis von Kollagen II und Kollagen IX im chondrozytären Anteil gelang insgesamt nicht. Grundsätzlich unterschieden sich die Markierungsverhalten von chondrozytärem und osteoblastärem Anteil sowohl mit knochen- als auch mit knorpeltypischen Markern überwiegend nur geringfügig.

Schlussfolgerungen:

1. Die dreidimensionale Kultivierung von humanen osteoblastären Zellen sowie Chondrozyten *in vitro* auf der gewählten kombinierten biphasischen Leitschiene ist unter kontinuierlicher, weitgehend getrennter Mediumversorgung über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen möglich. 2. Insbesondere innerhalb der Knochenleitschiene führte die Kultivierung zu dreidimensionalem Zellwachstum. 3. Die Zellen produzieren dabei Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie beispielsweise Osteocalcin, Kollagen I und Glykosaminoglykan. 4. Auch die Chondrozyten produzierten Marker der osteoblastären Kaskade wie beispielsweise Osteocalcin, was zum einen mit Dedifferenzierungseffekten zum anderen mit dem Vorliegen von hypertrophen Chondrozyten erklärbar wäre.

6. Literaturverzeichnis

1. Acil Y, Springer IN, Broek V, Terheyden H, Jepsen S (2002); Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different bio-materials; *J Cell Biochem* 86(1):90-98
2. Acil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S (2000); Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral; *J Biomed Mater Res* 51(4):703-710
3. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ et al. (2007); Effective Bone Engineering with Periosteum-derived Cells; *J Dent Res* 86(1):79-83
4. Aufmkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER (1985); Characterization of human bone cells in culture; *Calcif Tissue Int* 37(3):228-235
5. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG (2003); Design of a flow perfusion bio-reactor system for bone tissue-engineering applications; *Tissue Eng* 9(3):549-554
6. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993); Growth factors to stimulate bone formation; *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2:S565-S572
7. Benninghoff A, Drenckhahn D, Zenker W. *Anatomie*. 1 ed. Urban & Fischer Verlag, 2002.
8. Benya PD, Shaffer JD (1982); Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels; *Cell* 30(1):215-224
9. Bonzani IC, Adhikari R, Houshyar S, Mayadunne R, Gunatillake P, Stevens MM (2007); Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering; *Biomaterials* 28(3):423-433
10. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z (1996); Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response; *Biomaterials* 17(2):137-146

11. Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z (1999); Bone and cartilage tissue engineering; Clin Plast Surg 26(4):629-45, ix
12. Brent B (2002); Microtia repair with rib cartilage grafts: a review of personal experience with 1000 cases; Clin Plast Surg 29(2):257-71, vii
13. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994); Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation; N Engl J Med 331(14):889-895
14. Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L (1997); Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee; Bio-materials 18(3):235-242
15. Bruder SP, Fox BS (1999); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; Clin Orthop Relat Res(367 Suppl):S68-S83
16. Burg KJ, Holder WD, Jr., Culberson CR, Beiler RJ, Greene KG, Loeb sack AB et al. (2000); Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds; J Biomed Mater Res 51(4):642-649
17. Burkart AC, Schoettle PB, Imhoff AB (2001); [Surgical therapeutic possibilities of cartilage damage]; Unfallchirurg 104(9):798-807
18. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R (2003); Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone; Matrix Biol 22(1):81-91
19. Cao T, Ho KH, Teoh SH (2003); Scaffold design and in vitro study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling; Tissue Eng 9 Suppl 1:S103-12.:S103-S112
20. Chalmers JJ (1994); Cells and bubbles in sparged bioreactors; Cytotechnology 15(1-3):311-320
21. Chang CH, Kuo TF, Lin CC, Chou CH, Chen KH, Lin FH et al. (2006); Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks; Biomaterials 27(9):1876-1888

22. Chang CH, Lin FH, Lin CC, Chou CH, Liu HC (2004); Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71(2):313-321
23. Coelho MJ, Fernandes MH (2000); Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation; *Biomaterials* 21(11):1095-1102
24. Cornell CN (1999); Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts; *Orthop Clin North Am* 30(4):591-598
25. Cui JH, Park K, Park SR, Min BH (2006); Effects of low-intensity ultrasound on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells embedded in polyglycolic acid: an in vivo study; *Tissue Eng* 12(1):75-82
26. Dhurjati R, Liu X, Gay CV, Mastro AM, Vogler EA (2006); Extended-Term Culture of Bone Cells in a Compartmentalized Bioreactor; *Tissue Eng*
27. Dvir T, Benishti N, Shachar M, Cohen S (2006); A Novel Perfusion Bioreactor Providing a Homogenous Milieu for Tissue Regeneration; *Tissue Eng*
28. Freshney RI. *Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch*. 1. Auflage ed. Berlin, New York: de Gruyter, 1990.
29. Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J et al. (2002); Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants; *Cells Tissues Organs* 170(4):214-227
30. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI (2002); Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge; *Tissue Eng* 8(5):827-837
31. Garrett JC (1993); Osteochondral allografts; *Instr Course Lect* 42:355-8.:355-358
32. Goldstein AS (2001); Effect of seeding osteoprogenitor cells as dense clusters

- on cell growth and differentiation; *Tissue Eng* 7(6):817-827
33. Gross AE, Lavoie MV, McDermott P, Marks P (1985); The use of allograft bone in revision of total hip arthroplasty; *Clin Orthop Relat Res*(197):115-122
 34. Grundmann K, Zimmermann B, Barrach HJ, Merker HJ (1980); Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies; *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 389(2):167-187
 35. Haisch A, Loch A, David J, Pruss A, Hansen R, Sittinger M (2000); Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering; *Med Biol Eng Comput* 38(6):686-689
 36. Haisch A, Rathert T, Schultz O, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M. In Vitro Engineered Cartilage for Reconstructive Surgery, Using Biocompatible, Resorbable Fibrin Glue/Polymer Structures. In: Stark GB, Horch R, Tanczos E, editors. *Biological Matrices and Tissue Reconstruction*. Berlin: Springer-Verlag, 1998: 179-188.
 37. Hangody L, Fules P (2003); Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience; *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:25-32.:25-32
 38. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H et al. (1994); Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects; *J Orthop Res* 12(4):485-497
 39. Hentz VR, Chang J (2001); Tissue engineering for reconstruction of the thumb; *N Engl J Med* 344(20):1547-1548
 40. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000); Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period; *J Biomed Mater Res* 51(3):376-382
 41. Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB (1993); Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro; *Acta Orthop Scand*

- 64(4):441-445
42. Hunter W (1743); Of the structure and diseases of articulating cartilages; Phil Trans 42:514-521
 43. Hutmacher DW (2000); Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage; Biomaterials 21(24):2529-2543
 44. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC (2001); Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling; J Biomed Mater Res 55(2):203-216
 45. Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J et al. (2006); Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures; Tissue Eng 12(4):691-703
 46. Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP (1999); Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering; J Bone Joint Surg Am 81(3):306-316
 47. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997); Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro; J Cell Biochem 64(2):295-312
 48. Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M et al. (2001); Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro; J Cell Biochem 81(2):368-377
 49. Jiang J, Nicoll SB, Lu HH (2005); Co-culture of osteoblasts and chondrocytes modulates cellular differentiation in vitro; Biochem Biophys Res Commun 338(2):762-770
 50. Jones CA, Beaupre LA, Johnston DW, Suarez-Almazor ME (2005); Total joint arthroplasties: current concepts of patient outcomes after surgery; Clin Geriatr Med 21(3):527-41, vi
 51. Kamil SH, Kojima K, Vacanti MP, Zaporojan V, Vacanti CA, Eavey RD (2007);

- Tissue engineered cartilage: Utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture; *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71(1):71-75
52. Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C et al. (2004); [Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece]; *Orthopade* 33(1):76-85
53. Knaepler H, Haas H, Puschel HU (1991); [Biomechanical properties of heat and irradiation treated spongiosa]; *Unfallchirurgie* 17(4):194-199
54. Landis WJ, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Yanke A, Siperko L et al. (2005); Design and assessment of a tissue-engineered model of human phalanges and a small joint; *Orthod Craniofac Res* 8(4):303-312
55. Lanza RP, Langer R, Vacanti JP. *Principles of Tissue Engineering*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2000.
56. Lee HJ, Choi BH, Min BH, Son YS, Park SR (2006); Low-intensity ultrasound stimulation enhances chondrogenic differentiation in alginate culture of mesenchymal stem cells; *Artif Organs* 30(9):707-715
57. Leukers B, Gulkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M et al. (2005); Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing; *J Mater Sci Mater Med* 16(12):1121-1124
58. Lian JB, McKee MD, Todd AM, Gerstenfeld LC (1993); Induction of bone-related proteins, osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro; *J Cell Biochem* 52(2):206-219
59. Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*. 5. Auflage ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
60. Lindner A, Elliott M, Holzer F (1980); [Optimizing the fibrinogen-thrombin adhesive system]; *Wien Klin Wochenschr Suppl* 109:1-9
61. Lynn AK, Brooks RA, Bonfield W, Rushton N (2004); Repair of defects in articular joints. Prospects for material-based solutions in tissue engineering; *J Bone Joint Surg Br* 86(8):1093-1099

62. Mahmoudifar N, Doran PM (2005); Tissue engineering of human cartilage and osteochondral composites using recirculation bioreactors; *Biomaterials* 26(34):7012-7024
63. Marolt D, Augst A, Freed LE, Vepari C, Fajardo R, Patel N et al. (2006); Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors; *Biomaterials* 27(36):6138-6149
64. Masoud I, Shapiro F, Kent R, Moses A (1986); A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length, and tibial length; *J Orthop Res* 4(2):221-231
65. Mastrogiacomo M, Derubeis AR, Cancedda R (2005); Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells; *J Cell Physiol* 204(2):594-603
66. Meinhart J, Fussenegger M, Hobling W (1999); Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction; *Ann Plast Surg* 42(6):673-678
67. Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S (2000); Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering; *J Biomater Sci Polym Ed* 11(5):495-522
68. Minuth WW, Stockl G, Kloth S, Dermietzel R (1992); Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions; *Eur J Cell Biol* 57(1):132-137
69. Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. *Von der Zellkultur zum Tissue engineering*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 2002.
70. Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. *Tissue engineering*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2005.
71. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V et al. (2006); Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation; *Stem Cells* 24(4):1095-1103

72. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI (1992); Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo; *Clin Orthop Relat Res*(276):291-298
73. Nakaoka R, Hsiong SX, Mooney DJ (2006); Regulation of chondrocyte differentiation level via co-culture with osteoblasts; *Tissue Eng* 12(9):2425-2433
74. Niemeyer P, Mehlhorn A, Jaeger M, Kasten P, Simank HG, Krause U et al. (2004); [Adult mesenchymal stem cells for the regeneration of musculoskeletal tissue]; *MMW Fortschr Med* 146:107-113
75. Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S, Tabata S (1993); Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics; *J Biomed Mater Res* 27(11):1401-1407
76. Oliveira JM, Rodrigues MT, Silva SS, Malafaya PB, Gomes ME, Viegas CA et al. (2006); Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells; *Biomaterials* 27(36):6123-6137
77. Park SH, Sim WY, Park SW, Yang SS, Choi BH, Park SR et al. (2006); An Electromagnetic Compressive Force by Cell Exciter Stimulates Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells; *Tissue Eng*
78. Pautke C (2004); Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade; Dissertation
79. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M (2000); Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits; *Biomaterials* 21(11):1145-1153
80. Pfahler M, Lutz C, Anetzberger H, Maier M, Hausdorf J, Pellengahr C et al. (2003); Long-term results of high tibial osteotomy for medial osteoarthritis of the knee; *Acta Chir Belg* 103(6):603-606
81. Pipan CM, Glasheen WP, Matthew TL, Gonias SL, Hwang LJ, Jane JA et al. (1992); Effects of antifibrinolytic agents on the life span of fibrin sealant; *J*

- Surg Res 53(4):402-407
82. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; Science 284(5411):143-147
 83. Reddi AH (2000); Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials; Tissue Eng 6(4):351-359
 84. Risbud MV, Sitterling M (2002); Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation; Trends Biotechnol 20(8):351-356
 85. Rodriguez A, Pap S, Vacanti CA. The Effect of Long Term Culture on the Ability of Human Auricular Cartilage Chondrocytes to Generate Tissue Engineered Cartilage. In: Stark GB, Horch R, Tanczos E, editors. Biological Matrices and Tissue Reconstruction. Berlin: Springer-Verlag, 1998: 163-168.
 86. Rotter N, Haisch A, Bucheler M (2005); Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery; Eur Arch Otorhinolaryngol 262(7):539-545
 87. Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A et al. (2002); Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects; Arthritis Rheum 46(9):2524-2534
 88. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W (2006); Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering; Europ J Trauma 32(2):114-124
 89. Schultz O, Sitterling M, Haeupl T, Burmester GR (2000); Emerging strategies of bone and joint repair; Arthritis Res 2(6):433-436
 90. Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH, Zigang G (2006); Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model; Tissue Eng 12(6):1539-1551
 91. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG (2002); Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a ro-

- tating wall vessel bioreactor; J Biomed Mater Res 62(1):136-148
92. Sittinger M (1997); Tissue Engineering: Züchtung und Differenzierung von Knorpeltransplantaten; Habilitationsschrift
 93. Sittinger M, Braunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J (1997); [Proliferative potential of nasal septum chondrocytes for in vitro culture of cartilage transplants]; Laryngorhinootologie 76(2):96-100
 94. Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR (1994); Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture; Biomaterials 15(6):451-456
 95. Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR (1996); Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques; Biomaterials 17(3):237-242
 96. Spector M (1994); Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration; Clin Plast Surg 21(3):437-444
 97. Stanton LA, Beier F (2007); Inhibition of p38 MAPK signaling in chondrocyte cultures results in enhanced osteogenic differentiation of perichondral cells; Exp Cell Res 313(1):146-155
 98. Stengele M (2004); Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem; Dissertation
 99. Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Minuth WW (2002); Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering; Tissue Eng 8(1):37-42
 100. Stützle H, Kessler S, Mandelkow H, Schweiberer L (1991); [Organization of a bone bank]; Unfallchirurg 94(12):619-623
 101. Suh JK, Matthew HW (2000); Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review; Biomaterials 21(24):2589-2598
 102. Sun W, Darling A, Starly B, Nam J (2004); Computer-aided tissue engineering:

- overview, scope and challenges; *Biotechnol Appl Biochem* 39(Pt 1):29-47
103. Takagi M, Parmley RT, Toda Y, Denys FR (1983); Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in osteoblasts, osteoid, and bone matrix; *Calcif Tissue Int* 35(3):309-319
104. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ (2005); Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects; *J Bone Joint Surg Am* 87(6):1367-1378
105. Tischer T, Schieker M, Stengele M, Pautke C, Neth P, Jochum M et al. (2004); [3D-Culturing of human osteoblastic cells with vessel like nutrient supply]; *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142(3):344-349
106. Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL (2003); Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro; *Biomaterials* 24(20):3417-3426
107. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J (2001); Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone; *N Engl J Med* 344(20):1511-1514
108. van Susante JL, Buma P, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP (1998); Chondrocyte-seeded hydroxyapatite for repair of large articular cartilage defects. A pilot study in the goat; *Biomaterials* 19(24):2367-2374
109. von der Mark K, Gauss V, von der MH, Muller P (1977); Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture; *Nature* 267(5611):531-532
110. Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL (2006); Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes; *Biomaterials* 27(25):4434-4442
111. Weng Y, Cao Y, Silva CA, Vacanti MP, Vacanti CA (2001); Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction; *J Oral Maxillofac Surg* 59(2):185-190
112. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, Hubner U, Schmelzeisen R

- (2005); Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery; *J Mater Sci Mater Med* 16(1):57-66
113. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R (2002); How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials; *Biomaterials* 23(16):3319-3328
114. Wirth M, Berthold E, Grashoff M, Pfutzner H, Schubert U, Hauser H (1994); Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction; *Cytotechnology* 16(2):67-77
115. Wittenzellner R, Birner M, Püschel R, Skodacek D, Staudenmaier R, Wenzel M (2005); Optimierung der Fibrinogenisolation aus Vollblut zur Herstellung von autologem Fibrinkleber; *HNO-Informationen (Kongressabstracts)*
84:<http://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/HNO/doi/10.1055/s-2005-869238>
116. Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM et al. (2007); Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization; *Biomaterials* 28(2):335-343
117. Wozney JM, Seeherman HJ (2004); Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair; *Curr Opin Biotechnol* 15(5):392-398
118. Wu L, Wu Y, Lin Y, Jing W, Nie X, Qiao J et al. (2007); Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix; *Mol Cell Biochem*
119. Yamaguchi A (1995); Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily; *Semin Cell Biol* 6(3):165-173
120. Zhao F, Ma T (2005); Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development; *Biotechnol Bioeng* 91(4):482-493

Anhang

Protokoll 1 - Anfertigung von MMA-Einbettungen

1. Fixierung der Proben in Fixierungsgemisch (siehe unten) für 3 d bei + 4 °C
2. Für 1 d in 70 % ETOH bei + 4 °C
3. Für 1 d in 80 % ETOH bei + 4 °C
4. Für 1 d in 100 % ETOH bei + 4 °C
5. Für 1 d in 100 % ETOH bei + 4 °C
6. Für 1 d in 100 % Aceton bei + 4 °C
7. Für 2 d in Einbettgemisch (siehe unten) im Exsikkator
8. Für 2 d in Einbettgemisch (siehe unten) im Exsikkator
9. Für 2 d in Einbettgemisch bei + 4 °C nach 30 Min. im Exsikkator
10. Einbettgemisch bis Aushärtung im Wasserbad bei + 27 °C
11. Aushärten bei + 37 °C

Fixierungsgemisch:

- 1 Teil 35 % Formaldehyd in Aqua dest.
- 2 Teile 96 ml 100 % Methanol
- 4 ml Isotoner Glucose-Phosphatpuffer pH 7,4

Einbettgemisch:

- 100 ml Methylmetacrylat (MMA)
- 25 ml Plastoid N
- 3,5 g Benzoylperoxid

Protokoll 2 - Anfertigung Immunhistochemische Markierungen

1. Abgrenzen einzelner Schnitte auf den Glasobjektträgern mittels Fettstift
2. Rehydrieren (5 Min. in PBS 10 X)
3. Fixieren (30 Min. in 100 ml 100 % Methanol mit einer Beimischung von 1 ml 30 % H_2O_2 . (Wasserstoffperoxid) in Aqua dest.)
4. Waschen (3 x 5 Min. in PBS 10 X)
5. Blocken (60 Min. mit jeweils 1 Tropfen Pferdeserum (1:20 in PBS 10 X verdünnt) pro Schnitt
6. Abklopfen ohne Waschen
7. Inkubation (30 Min. mit jeweils 1 Tropfen der gewünschten Primärantikörper pro Schnitt, Kontrollen mit PBS 10 X)
8. Waschen (3 x 5 Min. in PBS)
9. Inkubation (30 Min. mit jeweils 1 Tropfen Sekundärantikörper pro Schnitt)
10. Herstellung des ABC-Komplexes (Zugabe von jeweils 20 μ l der Komponenten ABC-A und ABC-B zu 1 ml PBS 10 X. Vor Verwendung min. 30 Min. bei + 4 °C lagern und täglich frisch ansetzen)
11. Waschen (3 x 5 Min. in PBS)
12. Inkubation (30 Min. bei + 4 °C mit jeweils 1 Tropfen des zuvor hergestellten ABC-Komplexes pro Schnitt.
13. Waschen (3 x 5 Min. in PBS 10 X)
14. Inkubation (4 Min. mit jeweils 1 Tropfen der DAB-Lösung bei Dunkelheit)
15. Unterbrechung der DAB-Nachweisreaktion durch ausgiebige Spülung der Schnitte mit handwarmem Leitungswasser
16. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2 x 100 % Ethanol und 2 x 100 % Xylol)
17. Eindecken der Schnitte mit Deckgläsern mittels Eukitt

Abkürzungsverzeichnis

2B6+AC	Clone Number für Glykosaminoglykan
3B3*Abc	Clone Number für Glykosaminoglykan
ABC	Avidin-Biotin Complex
AON-1	Clone Number für Osteonectin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CAD / CAM	Computer aided design / Computer aided manufacturing
CIIICl	Clone Number für Kollagen II
Col1	Clone Number für Kollagen I
D1-9	Clone Number für Kollagen IX
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
FBS / FCS	Fetal Bovine Serum / Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FORTEPRO	Forschungsverbund für Tissue Engineering und Rapid Prototyping
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hMSC	Humane Mesenchymale Stammzelle
IHC	Immunhistochemie
IGF	Insulin-like Growth Factor
KIE	Kallikrein inhibierende Einheit
MMA	Methylmetacrylat
MPIIIB10	Clone Number für Osteopontin
OC1	Clone Number für Osteocalcin
PBS	Phosphat buffered saline
PGA	Polyglykolsäure
PCL	Polycaprolacton
PLA	Polylactid
PLGA	Poly-(D,L-lactid-Co-glycolid)-Acid
TGF	Transforming Growth Factor
WVID1(9C5)	Clone Number für Bonesialoprotein II

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an:

- Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas.
- Herrn Dr. Matthias Schieker, Leiter des Forschungslabors für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin, für die hervorragende und intensive Betreuung meiner Arbeit.
- Herrn Dr. Thomas Tischer, meinem Co-Betreuer, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich v.a. in der Anfertigung und Auswertung der immunhistochemischen Markierungen unterstützte.
- Herrn PD Dr. Stefan Milz vom Lehrstuhl Anatomie I der Anatomischen Anstalt der Universität München für den stetigen Zugang zur Laborinfrastruktur der Anatomischen Anstalt und für die wissenschaftliche Begleitung der feingeweblichen Untersuchungen.
- Herrn Dr. Christoph Pautke für seine Beratung in vielen Belangen.
- Frau Dr. rer. nat. Hülya Gülkan für die Begleitung meiner Arbeit.
- Frau Dr. Theda Balzer (ehem. Happ), wissenschaftliche Assistentin und Dr. Robert Wittenzellner, ehem. wissenschaftlicher Assistent an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der LMU München, für die Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe und die Bereitstellung von Knorpelmaterial.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Stengele, mein Vorgänger-Doktorand, der mich in einen Großteil der Methoden eingearbeitet hat und mir mit seiner grenzenlosen Geduld in zahllosen Gesprächen ganz entscheidend weitergeholfen hat. An dieser Stelle möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mir meinen Weg so ermöglichten und mich zu jeder Zeit mit all ihrer Kraft in allen Höhen und Tiefen, die dieser Weg mit sich brachte, unterstützten.

Lebenslauf

Lebenslauf

Stefanie Strobl Säzlstr. 6
85049 Ingolstadt

Persönliche Daten

Geburtsdatum 14. Juli 1979
Geburtsort Ingolstadt
Familienstand ledig

Ärztliche Tätigkeit

Seit 09/2005 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin am Spi-
tal Waldshut (Waldshut-Tiengen, Baden-Württemberg)
Dr. med. Harro Jenss

Hochschulbildung

05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004 – 03/2005 Praktisches Jahr
Chirurgie Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der
Universität München
Prof. Dr. Wolf Mutschler
Kantonsspital Nidwalden – Stans (Schweiz), Chirurgie –
Dr. med. Rudolf Herzig
Radiologie Klinik für Radiologie –Innenstadt, Klinikum der Universität
München
Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser
Innere Medizin Kantonsspital Nidwalden – Stans (Schweiz), Medizin –
Dr. med. Daniel Wegmann

03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2001 – 08/2003	Famulaturen im Bereich Chirurgie, Diabetologie, Pädiatrie, öffentliches Gesundheitswesen und Allgemeinmedizin
08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998 – 05/2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dissertation

03/2002 – 04/2007	"Knochen- und Knorpelzellwachstum im dreidimensionalen Ko-Kultursystem" Doktorvater: Prof. Dr. Wolf Mutschler Experimentelle Arbeit in der AGTEK (Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München (siehe auch www.agtek.de)
-------------------	--

Nebentätigkeiten

Seit 11/2005	Lehrtätigkeit an der Krankenpflegeschule Waldshut-Tiengen im Fach Innere Medizin
08/1994 – 01/2003	Gemeinschaftspraxis Dr. Stefan Schormair und Dr. Friedrich Strobl – Innere Medizin (Teilgebiet Gastroenterologie), Ingolstadt – Einsatz als Endoskopiehelferin

Schulbildung

09/1989 – 06/1998	Allgemeine Hochschulreife am Reuchlin-Gymnasium Ingolstadt - humanistischer Zweig Leistungskurse: Biologie und Altgriechisch
1985 – 1989	Grundschule in Ingolstadt

Publikationen

Abstracts, Präsentationen

- 11/2002 Strobl S, Tischer T, Happ T, Stengele M, Guelkan H, Milz S, Mutschler W, Schieker M
"Co-culturing osteoblasts and chondrocytes in a 3D-perfusion system *in vitro*"
Abstract: Langenbecks Arch Surg 2002 Oct;387(5-6): 258
Präsentation: 6. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie e.V., Köln
28. - 30. November 2002
- 11/2002 Strobl S
"Knochen- und Knorpelzellwachstum im dreidimensionalen Ko-Kultursystem"
Präsentation: Wissenschaftliches Kolloquium, Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt – Klinikum der Universität München
11. November 2002