

Aus der Klinik für Innere Medizin-Rheumatologie
in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hals-Nasen-Ohren Krankheiten
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Untersuchungen zur Biomechanik
und Histomorphologie von Tissue engineering Knorpel
aus humanen Nasenseptumchondrozyten**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Daniel Schroeder
aus
Ratingen

Gutachter: 1. Priv. Doz. Dr. rer.nat. M. Sittinger
2. Prof. Dr. med. S. Jonvanovic
3. Prof. Dr. med. C. Perka

Datum der Promotion:09.05.2006

Für meine Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------------|
| <u>1 EINLEITUNG.....</u> | <u>10</u> |
| <u>1.1 Bedarf an Materialien zum Ersatz von Knorpel.....</u> | <u>10</u> |
| <u>1.2 Beschreibung des nativen Knorpels.....</u> | <u>10</u> |
| <u>1.3 Reduziertes Regenerationspotential des nativen Knorpels.....</u> | <u>11</u> |
| <u>1.4 Herkömmliche Verfahren des Knorpelersatzes.....</u> | <u>11</u> |
| <u>1.5 Neue Möglichkeiten durch Tissue engineering.....</u> | <u>12</u> |
| <u>1.6 Problematik.....</u> | <u>13</u> |
| <u>1.7 Fragestellung.....</u> | <u>14</u> |
| | |
| <u>2 MATERIAL UND METHODEN.....</u> | <u>15</u> |
| <u>2.1 Ablauf der Arbeitsschritte als Fließschema.....</u> | <u>15</u> |
| <u>2.2 Geräte und Material.....</u> | <u>16</u> |
| <u>2.3 Angewendete Reagenzien.....</u> | <u>17</u> |
| 2.3.1 Alphabetische Auflistung mit Hersteller..... | 17 |
| 2.3.2 Zusammensetzung und Dosierung des Enzymmixes..... | 17 |
| 2.3.3 Zusammensetzung des Fibrinklebers Tissucol®..... | 18 |
| <u>2.4 Kulturmedien.....</u> | <u>18</u> |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1 Roh-Medien..... | 18 |
| 2.4.2 Zusammensetzung der Medien..... | 19 |
| 2.5 Vitale Komponenten..... | 19 |
| 2.5.1 Humaner Nasenseptumknorpel als Ausgangsmaterial..... | 19 |
| 2.5.2 Verfahren zur Chondrozytenisolierung..... | 19 |
| 2.5.3 Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung..... | 20 |
| 2.5.4 Nasenseptumknorpel als Kontrollgruppe..... | 20 |
| 2.6 Vermehrung der Chondrozyten in der Zellkultur..... | 20 |
| 2.6.1 Kultivierung der gewonnenen Zellen in der Monolayer-Kultur..... | 20 |
| 2.6.2 Passage der Zellen in Monolayer-Kultur..... | 21 |
| 2.7 Herstellung des Tissue engineering Knorpels..... | 21 |
| 2.7.1 Beschreibung des Trägermaterials..... | 21 |
| 2.7.2 Herstellung des Zell-Vlies Konstruktes..... | 22 |
| 2.8 Transplantation im Tiermodell..... | 22 |
| 2.8.1 Versuchstiere und deren Haltung..... | 22 |
| 2.8.2 Narkose der Versuchstiere vor der Implantation..... | 23 |
| 2.8.3 Technik der Implantation..... | 23 |
| 2.8.4 Technik der Explantation..... | 24 |
| 2.9 Biomechanische Messungen..... | 24 |
| 2.9.1 Physikalische Grundlagen..... | 24 |
| 2.9.2 Aufbau der Materialprüfmaschine..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9.3 Ablauf der biomechanischen Testung..... | 26 |
| <u>2.10 Angewendete histologische Färbungen.....</u> | 27 |
| <u>2.11 Statistik.....</u> | 27 |
| <u>3 ERGEBNISSE.....</u> | 28 |
| <u>3.1 Verlauf der Tierexperimente.....</u> | 28 |
| <u>3.2 Makroskopischer Aspekt nach Explantation.....</u> | 28 |
| <u>3.3 Histologische Untersuchung.....</u> | 30 |
| 3.3.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)..... | 30 |
| 3.3.2 Masson-Goldner-Färbung (MG)..... | 32 |
| 3.3.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)..... | 34 |
| 3.3.4 Zusammenfassung der wichtigsten histologischen Eigenschaften..... | 36 |
| <u>3.4 Biomechanische Testung.....</u> | 36 |
| 3.4.1 Versagensspannung..... | 36 |
| 3.4.2 Kruskal-Wallis Test..... | 37 |
| <u>4 DISKUSSION.....</u> | 40 |
| <u>4.1 Beurteilung des TE Knorpel Herstellungsverfahrens.....</u> | 40 |
| 4.1.1 Chondrozytenisolierung und Zellamplifikation..... | 40 |
| 4.1.2 Kritische Betrachtung der verwendeten TE Herstellungsmethode..... | 40 |
| <u>4.2 Biomechanische Messung.....</u> | 41 |

| | |
|--|--------------|
| 4.2.1 Vor- und Nachteile des verwendeten Messverfahrens..... | 41 |
| 4.2.2 Evaluation der gemessenen biomechanischen Werte..... | 42 |
| <u>4.3 Tissue engineering Knorpel und nativer Knorpel im Vergleich.....</u> | 43 |
| <u>4.4 Ausblick und Perspektiven.....</u> | 44 |
| | |
| <u>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</u> | 46 |
| | |
| <u>6 DANKSAGUNG.....</u> | 48 |
| | |
| <u>7 LEBENSLAUF.....</u> | 49 |
| | |
| <u>8 ANHANG MIT DEN VOLLSTÄNDIGEN.....</u> | |
| <u>ERGEBNISTABELLEN.....</u> | 51 |
| | |
| <u>9 LITERATUR.....</u> | 54 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|------------|---|
| CD-1 nu/nu | thymusinkompetente Nacktmaus, Stamm CD-1, männlich, homozygot |
| Df | errechnete Freiheitsgrade |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FCS | fetal calf serum (fötales Kälberserum) |
| HE | Hämatoxilin-Eosin |
| I.E. | Internationale Einheiten |
| MG | Masson-Goldner |
| mM | Millimol |
| N | Newton |
| n. meßbar | nicht meßbar |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PAS | Perjodsäure-Schiff Reaktion |
| PBS | phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Lösung) |
| PDS | Polydioxanon |
| RPMI | Rosswell Park Memorial Institute |
| TE | Tissue engineering |
| W/ | mit (with auf englisch) |
| W/o | ohne (without auf englisch) |
| X | optische Vergrößerung (x-fach) |

1 Einleitung

1.1 *Bedarf an Materialien zum Ersatz von Knorpel*

Von mehreren Fachgebieten der Medizin ausgehend besteht ein grosser Bedarf an Implantatmaterial zum Ersatz von Knorpel, der mit den herkömmlichen Methoden nicht zufriedenstellend gedeckt werden kann. Einen Ausweg könnte eine neuartige Technik, das Tissue engineering, bieten, mit dem autologer Neoknorpel hergestellt werden kann. Die Qualität des mit Tissue engineering hergestellten Gewebes soll in dieser Arbeit untersucht werden. Vorab sei eine Einführung über den Knorpel gestellt.

Knorpel übernimmt nicht nur mechanische Funktionen an exponierten Stellen des Körpers, sondern ist auch maßgeblich an seiner Struktur und Formgebung beteiligt. Kann Knorpel als Folge von pathologischen Prozessen nicht mehr seine Funktion erfüllen oder fehlt er nach einem traumatischen Ereignis, muß fast immer ein Ersatz gefunden werden. Dies gilt nicht nur für den mechanisch-funktionellen Bereich, sondern auch für ästhetische Beeinträchtigungen, da diese ebenso zu einer Minderung der Lebensqualität führen können.

In der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, der Unfall- und Kieferchirurgie wird Material für rekonstruktive Operationen benötigt, um Ohrmuschelrekonstruktionen^{1,2}, Rhinoplastiken^{3,4}, Trachealersatz und Defektrekonstruktion nach ausgedehnten Tumorresektionen⁵ oder nach traumatischen Substanzverlusten vorzunehmen^{6,7,8}.

In der Orthopädie wird Ersatzmaterial zur Rekonstruktion nach Trauma- oder Tumorchirurgie^{9,10}, zur Korrektur von Missbildungen, vor allem aber zur Auffüllung und Deckung von Defekten der Gelenkflächen^{11,12,13,14} verwendet.

1.2 *Beschreibung des nativen Knorpels*

Im menschlichen Körper findet man drei verschiedene Arten von Knorpel. Es sind der hyaline, der elastische und der Faserknorpel. Jede Art von Knorpel ist für die jeweilige Funktion, die er im Körper ausübt, in seinem Aufbau optimal zusammengesetzt. Der häufigste ist der hyaline Knorpel, der als Nasenknorpel, im Kehlkopf, den Luftwegen, am Rippenansatz und als Gelenkflächenüberzug vorkommt. Den elastischen Knorpel findet man im äußeren Gehörgang, an der Epiglottis und in der Ohrmuschel. Der Faserknorpel ist meistens Teil einer Gelenkstruktur, wie die Disci intervertebrales, den Menisci, oder Symphysis pubica.

Nativer Knorpel besteht bis zu 80 % aus Wasser. Er enthält Proteoglykane und Proteine, wie

Kollagen und Elastin. Mehrere Subtypen des Kollagens konnten bisher bestimmt werden, wovon das Kollagen Typ II in allen drei Knorpelarten den prädominierenden Teil einnimmt¹⁵.

1.3 Reduziertes Regenerationspotential des nativen Knorpels

Schon vor über zweihundert Jahren wurde erkannt, daß das Regenerationsvermögen des ausdifferenzierten Knorpels sehr gering ist¹⁶. Nach Auftritt eines Defektes kann dieses bradytrophe Gewebe nur in sehr begrenztem Umfang seine ursprüngliche Struktur wiederherstellen¹⁷. Das entstandene Reparaturgewebe für den Knorpel ist jedoch qualitativ minderwertiger, da es sich um eine Art Narbengewebe handelt^{18,19,20}. Dieses enthält hauptsächlich Kollagen Typ I statt dem üblichen Kollagen Typ II²¹, hat einen stark reduzierten Gehalt an Proteoglykanen und ist dadurch weniger belastbar als intaktes Knorpelgewebe. Die ursprüngliche Form des verletzten Knorpels geht während des Reparaturprozesses verloren.

1.4 Herkömmliche Verfahren des Knorpelersatzes

Zur Gewinnung von Ersatzmaterialien sind inzwischen viele Verfahren entwickelt worden. Die Verwendung herkömmlicher autologer Knorpeltransplantate ist momentan das verbreitetste Verfahren mit den besten klinischen Ergebnissen²². Es besteht jedoch eine erhebliche Einschränkung hinsichtlich der verfügbaren Quantität des Transplantatmaterials. Des weiteren addieren sich alle Risiken eines chirurgischen Eingriffes an einer zweiten Lokalisation²³ hinzu.

Allogene Transplantate, d.h. eines genetisch differenten Spenders von der gleichen Spezies, bergen ein Infektionsrisiko, müssen vor ihrer Anwendung antiseptisch behandelt werden²⁴ und unterliegen in vivo einer hohen Resorptionsrate²⁵, die durch verminderte Vitalität und immunologische Abstoßungsprozesse hervorgerufen wird²⁶.

Xenogene Transplantate, d.h. eines Spenders einer anderen Spezies, besonders bovines Material, konnten sich nicht durchsetzen, da trotz Konservierung und Bestrahlung²⁷ eine vergleichsweise hohe Infektions- und Resorptionsrate resultiert, nicht zuletzt aus Gründen der immunologischen Reaktion²⁸.

Alloplastische Implantate umfasst als Begriff eine Vielzahl von anorganischen Materialien²⁹. Neben Legierungen von Stahl, Titan oder Kobalt, kommen auch Silikon und Spezialkeramiken³⁰ zum Einsatz. In der Praxis bilden diese Implantate als Fremdkörper im Organismus häufig eine Quelle für Infektionen. Sie können auch allergische Reaktionen auslösen. Auf Dauer sind sie durch Korrosion, Degradation oder Ermüdungserscheinungen gefährdet.

1.5 Neue Möglichkeiten durch Tissue engineering

Eine neue wegweisende Technik zur Herstellung geeigneter Knorpeltransplantate ist das Tissue engineering³¹. Es ist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit von Biomaterialentwicklung, Zellbiologie und Zellkulturtechnik³². Einer der Pioniere des Tissue engineering, C.A. Vacanti definierte es als „Wissenschaft, in der die Materialeigenschaften einer synthetischen Einheit genutzt werden, um das Einbringen eines Aggregates dissoziierter Zellen in einen Empfänger zu ermöglichen, so daß daraus neues, funktionstüchtiges Gewebe gebildet wird³³.“ Für Knorpeltransplantate stellt das Tissue engineering eine neue Möglichkeit dar, mit einem Minimum autologen Gewebes als Ausgangsmaterial, einen maximalen Bereich eines Defektes zu decken. Dem Patienten wird eine kleine Knorpelbiopsie aus dem Nasenseptum, dem Ohr oder der Rippe entnommen. Mittels Enzymen wird die Gewebematrix aufgelöst. Die Zellen können isoliert und im Monolayersystem kultiviert werden. In vitro findet eine Dedifferenzierung statt, die mit einer Veränderung des Phänotyps in Richtung Fibroblasten³⁴ und einer knorpeluntypischen Bildung von Kollagen Typ I und III einhergeht³⁵. Durch die Dedifferenzierung ist es möglich, die Chondrozyten zu vermehren. Gleichzeitig bewahren sie die Fähigkeit, auch nach Langzeitkultivierung, knorpelspezifische Moleküle zu exprimieren³⁶. Wenige Wochen später sind, nach einer Vermehrung um den Faktor 1000 bis maximal 1 Mio³⁷, genügend Zellen vorhanden, um mit diesen neues, autologes Knorpelgewebe in größeren Mengen zur Transplantation herzustellen³⁸. Die expandierten Zellen werden in ein dreidimensionales Polymervlies eingebracht und mit Hilfe von Fibrinkleber fixiert. So angeordnet, findet eine Redifferenzierung der Chondrozyten statt^{39,40,41,42}. Immunhistochemisch lassen sich wieder Chondroitinsulfat, Proteoglykan und die Synthese von Kollagen Typ II nachweisen⁴³. Die redifferenzierten Chondrozyten produzieren nun das, was die Qualität ihres Gewebes ausmacht: die knorpeltypische interzelluläre Matrix. Es findet also eine de-novo Synthese eines dem körpereigenen sehr ähnlichen Knorpels statt.

Mit dieser Methode könnte die Verfügbarkeit von autologem Gewebe erheblich erweitert und die Abwehrreaktion des Immunsystems theoretisch auf ein Minimum reduziert werden. Ein weiterer Vorteil ist die völlig frei zu gestaltende Formgebung des entstehenden Knorpeltransplantates. Gelenkoberflächen, Nasenflügel, Trachealspangen, sogar ganze Auriculae können theoretisch damit rekonstruiert werden⁴⁴.

1.6 Problematik

Bevor es zu einer Anwendung des Tissue engineering Knorpel kommen kann, sollte dieser genauer auf seine Qualitäten als Implantationsmaterial evaluiert werden⁴⁵. Die bisherigen Studien hatten sich hauptsächlich auf die histologische und biochemische Untersuchung, sowie geeignete Trägermaterialien konzentriert^{46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59}. Für eine potentielle klinische Anwendbarkeit des neuartigen Gewebes ist jedoch auch eine ausreichende mechanische Stabilität unumgänglich. Nur ein Material, das in der Praxis handhabbar ist, seine Form beibehält und den lokalen mechanischen Belastungen widersteht⁶⁰, ist für eine Implantation geeignet. Die biomechanischen Eigenschaften des Tissue engineering Knorpels sind bisher schon in einigen Experimenten erforscht worden^{58,61,62,63,64,65,66}. Die genannten Experimente orientierten sich jedoch häufig an in vitro Verfahren oder Tiermodellen ohne humanes Gewebe. Die verwendeten Chondrozyten sind generell nicht amplifiziert worden. Ein Vergleich mit nativem Knorpel fehlt in den meisten Studien.

In der vorgelegten Arbeit wurden humane Nasenseptumchondrozyten nach Amplifikation in ein in vivo Modell ausgesät, um anschließend die histologischen und mechanischen Qualitäten des neu entstandenen Gewebes zu bestimmen, und diese mit dem Ausgangsmaterial, nativem humanen Septumknorpel zu vergleichen. Ein histologischer Vergleich war notwendig, um bekannte Fehlerquellen der biomechanischen Auswertung zu minimieren^{57,67}.

1.7 Fragestellung

Wie stellt sich der durch Tissue engineering hergestellte Knorpel histologisch im Vergleich zu nativem Septumknorpel dar?

Wie sind die biomechanischen Eigenschaften des mit Hilfe von Tissue engineering aus humanem Nasenseptum hergestellten Knorpels und sind sie mit nativem Nasenseptumknorpel vergleichbar?

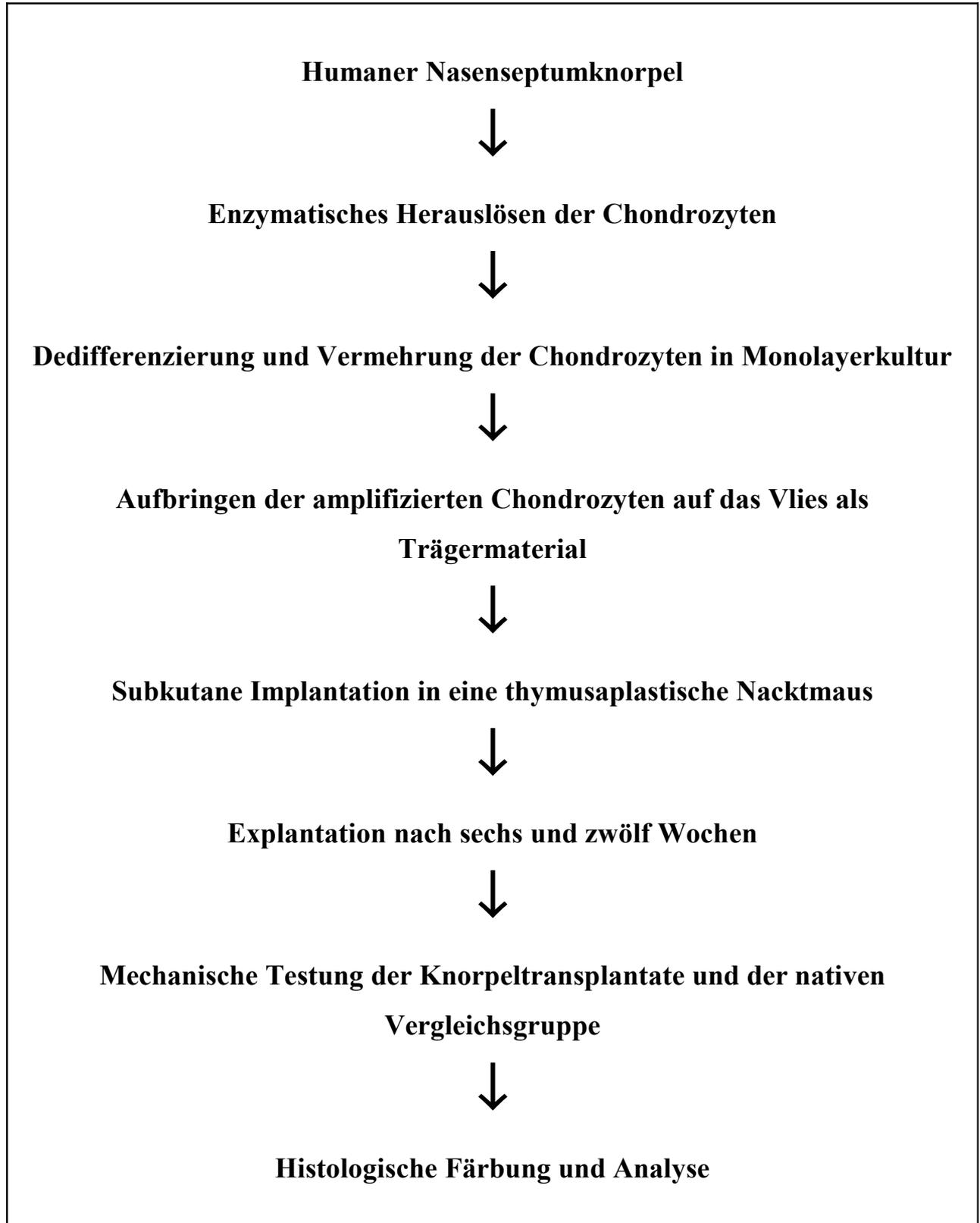
Kann mit dem beschriebenen Verfahren des Tissue engineering verlässlich Knorpel hergestellt werden?

Haben unterschiedliche Implantationsintervalle einen Einfluss auf das biomechanische Verhalten und das histologische Bild von Tissue engineering Knorpel?

Lassen die biomechanischen Eigenschaften des Tissue engineering Knorpel einen klinischen Einsatz zu?

2 Material und Methoden

2.1 Ablauf der Arbeitsschritte als Fließschema



2.2 Geräte und Material

| | |
|---|--|
| Brutschrank mit CO ₂ -Begasung | Heraeus, Osterode, Deutschland |
| Einwegspritzen 1, 2, 10 ml | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Einwegkanülen | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Einmal-Spritzenvorsatzfilter | Schleicher & Schuell, Einbeck, Deutschland |
| Falcon Röhrchen 50 ml | Falcon, Heidelberg, Deutschland |
| Gewebekulturflaschen 80 cm ² , 175 cm ² | Nunc, Wiesbaden, Deutschland |
| Handschuhe Latex Micro-Touch | Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Laminar-Flow-Bench Antair BSK | Baker Company, Stanford, USA |
| Lamir Air Flow, Typ G1 | W. Ehret, Emmendingen, Deutschland |
| Materialprüfmaschine Zwick 1455 | Zwick, Ulm, Deutschland |
| Mikroskop Leica, Typ DMIL | Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland |
| Nahtmaterial, Seralon | Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Nylonnetz | Reichelt, Heidelberg, Deutschland |
| Petrischalen | Cellstar, Nürtingen, Deutschland |
| Polymer-Vlies Ethisorb [®] -210 | Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland |
| Pipettierhilfe accu-jet | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml | Falcon, Heidelberg, Deutschland |
| Skalpelle Nr. 21 | Bard Parker, Becton Dickson, USA |
| Spinnerflaschen 50 ml | Wheaton, Ringoes, USA |
| 24-Well Platte Falcon, | Heidelberg, Deutschland |
| Zentrifuge GS-6R | Beckmann Instruments, San Remo, USA |

2.3 Angewendete Reagenzien

2.3.1 Alphabetische Auflistung mit Hersteller

| | |
|-------------------------------|--|
| Ascorbinsäure-Pulver | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Äther | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Braunol® | B. Braun, Melsungen, Deutschland |
| Ethanol (70 %) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| FCS, auf Mycoplasmen getestet | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| Fibrinkleber Tissucol® Duo S1 | Baxter, Unterschleissheim, Deutschland |
| Hepes | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| Hyaluronidase | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ketanest (50 mg/ml) | Parke-Davis, Berlin, Deutschland |
| Kollagenase II | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| Kollagenase P | Boehringer, Mannheim, Deutschland |
| L-Glutamin (200 mM) | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| L-Prolin | Sigma Cellculture, St.Louis, USA |
| NaCl (0,9 %) | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Penicillin-Streptomycin | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| Rhompun | Bayer, Leverkusen, Deutschland |
| Trypsin/EDTA | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |

2.3.2 Zusammensetzung und Dosierung des Enzymmixes

| | |
|------------------------------|-----------|
| RPMI-Medium (10 % FCS + P/S) | 30 ml |
| Kollagenase P | 1 mg/ml |
| Hyaluronidase | 0,1 mg/ml |
| Kollagenase II | 0,1 mg/ml |

2.3.3 Zusammensetzung des Fibrinklebers Tissucol®

1 ml Fertigspritze Thrombinlösung tiefgefroren enthielt:

| | |
|----------------|---|
| Thrombin-human | 500 I.E. |
| Calciumchlorid | 5,88 mg |
| Hilfsstoffe | Natriumchlorid, Glycin, Aqua ad injectionem |

1 ml Fertigspritze Kleberproteinlösung tiefgefroren enthielt:

| | |
|--|--|
| Humanplasmafraktion | 80-120 mg |
| Fibrinogen | 70-110 mg |
| Gerinnungsfaktor XIII (FSF, Fibrinolygase) | 10-50 I.E. |
| Plasmafibronectin | 2-9 mg |
| Plasminogen | 0,02-0,08 mg |
| Aprotinin-bovin | 3.000.000 I.E. |
| Hilfsstoffe | Natriumcitrat, Natriumchlorid, Glycin, Humanalbumin, Heparin, Triton, Creatin, Aqua ad injectionem |

2.4 Kulturmedien

2.4.1 Roh-Medien

| | |
|---|--|
| HANK's Salt Solution 500 ml | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| w/ Phenol red | |
| w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | |
| HAM's F-12 Medium 500 ml | Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland |
| w/ 10 mg/l Phenol red | |
| w/ 1,176 g/l NaHCO ₃ | |
| w/o Glutamine | |

2.4.2 Zusammensetzung der Medien

RPMI-Medium:

| | |
|---|--------|
| RPMI-Medium 1640 | 500 ml |
| FCS (bei 56°C während 30 min inaktiviert und filtriert) | 50 ml |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 I.E./10.000 µg/ml) | 5 ml |

HAM-Medium:

| | |
|---|----------|
| HAM's F-12 Medium | 500 ml |
| FCS (bei 56°C während 30 min inaktiviert und filtriert) | 25 ml |
| Prolin | 70 mg/ml |
| Glutamin | 200 mMol |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 I.E./10.000 µg/ml) | 5 ml |
| Hepes | 5 ml |

2.5 Vitale Komponenten

2.5.1 Humaner Nasenseptumknorpel als Ausgangsmaterial

Als Quelle der Chondrozytenisolierung dienten Gewebestücke humanen Nasenseptumknorpels, die bei korrektiven rhinochirurgischen Eingriffen durch subperichondrale Exzision in der HNO-Abteilung der Charité anfielen. Sie wurden postoperativ bei 8°C in RPMI-Medium gelagert und nach spätestens 36 Stunden verarbeitet. Um ein einheitliches Ergebnis zu erzielen und Differenzen der Proliferationsraten zu vermindern, wurden die Ansätze aus Gewebeproben von mindestens fünf Patienten gepoolt.

2.5.2 Verfahren zur Chondrozytenisolierung

Zuerst wurden die Knorpelstücke mit 70 % Alkohol desinfiziert und anschließend doppelt mit PBS gewaschen, bis keine Blutreste als Verunreinigung mehr vorhanden waren. Eventuell vorhandene Knochen oder Bindegewebsreste wurden mit einem sterilen Skalpell in einer Petrischale entfernt, um den so isolierten Knorpel so fein wie möglich zu zerkleinern. Zur Auflösung der Knorpelmatrix und Isolierung der einzelnen Chondrozyten wurde der Knorpel anschließend in Spinnerflaschen mit einer Enzymlösung unter Brutschrankbedingungen 16-18 Stunden inkubiert. Die Enzymlösung bestand aus drei Komponenten: Kollagenase II,

Kollagenase P und Hyaluronidase. Die resultierende Zellsuspension wurde durch ein steriles Nylonnetz der Porengröße 80 µm in Falconröhrchen filtriert. Das 50 ml Röhrchen wurde nun mit HANK'S Salt Solution aufgefüllt und bei 1800 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Um eventuelle Zelltrümmer zu vermeiden, wurde dieser Vorgang nach Abpipettieren des Überstandes wiederholt. Das resultierende Pellet wurde mit 5 ml Nährmedium resuspendiert und die Zahl der Chondrozyten und deren Vitalität bestimmt.

2.5.3 Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl und die Vitalität der isolierten Chondrozyten wurde mittels der Trypan-Blau Methode bestimmt. Bei dieser Methode bleiben die vitalen Zellen unberührt; der blaue Farbstoff kann nur durch die Zellmembran dringen und Zellkern und Zytoplasma blau anfärben, wenn die Zellen vorgeschädigt oder avital sind.

Die Trypan-Blau Lösung wurde dabei 1:1 (je 10 µl) mit der Zellsuspension vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei entsprach der Anteil der vitalen Zellen den ungefärbten Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl.

2.5.4 Nasenseptumknorpel als Kontrollgruppe

Als Vergleich zu dem in vitro hergestellten Knorpel wurde nativer humaner Nasenseptumknorpel ausgewählt, der bei korrekativen Eingriffen in der HNO-Abteilung der Charité anfiel. Es handelt sich dabei um hyalinen Knorpel und somit um ein Material, das zu plastisch-rekonstruktiver Chirurgie gut geeignet ist. Das Alter der Patienten lag zwischen 20-55 Jahren. Die Gewebestücke wurden nach dem chirurgischen Eingriff bei 8°C maximal 36 Stunden in RPMI-Medium gelagert. Vor der biomechanischen Testung wurden eventuell adhärierende knöchernere Anteile mit einem Skalpell entfernt. Die einzelnen Nasenseptumpräparate waren den natürlichen anatomischen Gegebenheiten unterworfen und variierten somit in Form und Dicke. Deshalb wurden die Gewebestücke vorselektioniert und nur die wenigen gemessen, die den Maßen 1x1x 0,2 cm der Transplantate entsprachen.

2.6 Vermehrung der Chondrozyten in der Zellkultur

2.6.1 Kultivierung der gewonnenen Zellen in der Monolayer-Kultur

Isolierte Chondrozyten, deren Vitalität über 90 % lag, wurden in 175 cm² große Kulturflaschen mit einer Zelldichte von 35.000 Zellen/cm² eingebracht. Die Kulturflasche wurde dann mit 45 ml RPMI-Medium aufgefüllt, das zwei Mal pro Woche gewechselt wurde, nachdem die Zellen sich

gesetzt hatten und an dem Boden des Kulturgefäßes adhärent waren. Die äußeren Bedingungen der Kultivierung waren eine konstante Temperatur von 37°C und eine 5 % CO₂-Begasung. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese mit einer sogenannten Passage in neue Kulturflaschen überführt, um dort in geringerer Dichte sich besser vermehren zu können.

2.6.2 Passage der Zellen in Monolayer-Kultur

Zur Vorbereitung auf die Passage wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gespült, um Reste des FCS zu entfernen, die der Passage hinderlich gewesen wären. Die Zellen wurden nun mit der Trypsin/EDTA Lösung 3-5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde dabei immer wieder im Mikroskop überprüft und schließlich mit der dreifachen Menge RPMI-Medium gestoppt. In einem Falconröhrchen wurde diese Zellsuspension bei 1800 U/min zentrifugiert, gezählt, auf Vitalität geprüft und in neue Kulturflaschen mit einer Dichte von 35.000 Zellen/cm² ausgesät. Die isolierten Chondrozyten wurden maximal fünf Mal passagiert.

2.7 Herstellung des Tissue engineering Knorpels

2.7.1 Beschreibung des Trägermaterials

Als Trägermaterial für die Chondrozytensuspension dienten Ethisorb[®]-210 Vliese. Dabei handelte es sich um ein nichtgewobenes, resorbierbares Co-Polymer-Vlies aus Poly-L-Glykolid und Poly-L-Laktid im Verhältnis 9:1, das nur punktuell verklebt war⁶⁸. Die Grundsubstanz war schon seit langem als Nahtmaterial im Einsatz, war biokompatibel und hatte sich klinisch bewährt. Bei minimaler Substanz bot das Vlies eine große innere Oberfläche für die Bindung der Chondrozyten. Anfangs hatte es eine hohe Stabilität, die sehr wichtig für die gleichmäßige Verteilung der Chondrozyten im Neoknorpel war. Es wurde innerhalb von Wochen in seine Bestandteile abgebaut: Laktat und Glykolat, zwei Monomere⁶⁹, die physiologischerweise im menschlichen Organismus vorkommen⁷⁰.

Die einzelnen Vliese hatten eine Größe von 1x1x 0,2 cm. Das entsprach einem Volumen von 200 µl. Sie waren vom Hersteller Ethicon zugeschnitten und sterilisiert worden.

2.7.2 Herstellung des Zell-Vlies Konstruktes

Nach entsprechender Expansion auf die gewünschte Zellzahl wurden die vermehrten Zellen wie bei einer Passage aus den Kulturflaschen mittels einer Trypsin/EDTA Suspension abgelöst, gewaschen und zentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden auf ihre Vitalität geprüft, gezählt, und mit der Fibrinogenkomponente des Tissucol® im Verhältnis 1:3 vermischt, so daß es eine Suspension von 30 Millionen Zellen pro Mililiter ergab. Pro Vlies entsprach das bei einem Volumen von 200 µl einer Zellzahl von sechs Millionen.

Das Vlies wurde in der Zell-Fibrinogenlösung gebadet und diese solange mit Hilfe einer Pipette durch das Polymer gesogen, bis dieses die vorhandene Flüssigkeit vollständig und ohne erkennbare Luftblasen absorbiert hatte. Das Thrombin wurde mit PBS 1:10 verdünnt und anschließend das durchtränkte Vlies damit von allen Seiten benetzt. In einer 24-Well Platte polymerisierte das Konstrukt unter Brutschrankbedingungen 20-25 Minuten aus.

Nach dem ersten Trocknen wurde auf das nun schon mit Zellen verquickte Vlies noch einmal eine dünne Schicht der Zell-Fibrinogen Lösung aufgebracht, mit verdünntem Thrombin benetzt und erneut getrocknet. Dieser Arbeitsschritt sollte eine Art Kapsel erzeugen.

Als Nährlösung für das fertige Konstrukt diente HAM-Medium. Das Medium wurde zwei Mal täglich gewechselt. Die Kulturbedingungen blieben unverändert 37°C und 5 % CO₂-Begasung. Nach fünf bis sechs Tagen konnte dann die Implantation in die Nacktmäuse vorgenommen werden.

2.8 Transplantation im Tiermodell

2.8.1 Versuchstiere und deren Haltung

Zur Implantation wurden weibliche, homozygote Nacktmäuse vom Stamm CD-1 nu/nu verwendet. Diese waren aufgrund eines autosomal-rezessiven Gendefektes thymusaplastisch^{71,72}, d.h. der nur rudimentär veranlagte Thymus war nicht in der Lage, funktionelle T-Zellen zu bilden. Somit konnte in dem System der Nacktmaus keine spezifische Immunreaktion hervorgerufen werden. Die B-Zelllinie war davon jedoch unberührt⁷³.

Das Alter der Mäuse lag bei Ankunft zwischen 35 und 40 Tagen, ihr Gewicht zwischen 35 und 45 Gramm. Die Tiere wurden in Gruppen von mindestens zwei und maximal zehn in einem Polycarbonkäfig auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Die Haltung erfolgte in einem Lamir Air Flow. Die Beleuchtung war von 7-19 h eingeschaltet. Die Umgebungstemperatur betrug 26°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 %. Als Nahrung erhielten die Tiere kontinuierlich

autoklavierte Alleindiät und steriles Leitungswasser. Alle Tierversuche waren von dem gesetzlichen Vertreter unter der internen Registrier-Nummer 0151/98 genehmigt worden. Die Tierschutzverordnung unserer Forschungseinrichtung wurde ständig eingehalten.

2.8.2 Narkose der Versuchstiere vor der Implantation

Zur Betäubung der Versuchstiere wurden 250 µl Lösung (10:1,6 Ketanest 50 mg/ml, Rhompun 0,2 %) mit 750 µl NaCl 0,9 % verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 250 µl pro Maus intramuskulär injiziert. Zur Protektion der Augen vor Austrocknung wurde eine isotonische Kochsalzlösung aufgetropft.

2.8.3 Technik der Implantation

Die Implantation der Knorpeltransplantate erfolgte unter sterilen Bedingungen nach Desinfektion der Mäusehaut mit Braunol[®]. Von einem transversalen Schnitt im Nackenbereich der Maus wurde eine subkutane Tasche kaudal des Schnittes freipräpariert, in die das Transplantat so weit hineingeschoben wurde, daß ein Kontakt mit dem Hautschnitt ausgeschlossen war. Der Wundverschluß erfolgte durch drei Einzelknopfnähte mit resorbierbarem Faden (Seralon, Ethicon[®]). Abschließend wurde die Wunde mit Braunol[®] betupft und mit einem Sprühverband verschlossen.



Abbildung 1: Einbringen der Transplantate in die subkutane Tasche

2.8.4 Technik der Explantation

Zur Explantation des Neoknorpels wurden die Nacktmäuse mit einer lethalen Äthernarkose eingeschlüfert. Die Knorpeltransplantate wurden nach einem initialen Hautschnitt stumpf mit Pinzette und Schere aus der subkutanen Tasche präpariert, in physiologischer Kochsalzlösung transportiert und innerhalb von drei Stunden an der Materialprüfmaschine getestet.

2.9 Biomechanische Messungen

2.9.1 Physikalische Grundlagen

Während der Messung wurde eine Kraft entlang der Längsachse des Transplantates ausgeübt, die damit das Material stauchte. Um danach die relative Längenänderung (ϵ) zu bestimmen, bezog man die Längenänderung (ΔL) auf die Anfangslänge (l):

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{l}$$

Die Normalspannung (σ) ist der Betrag der Kraft (F), die senkrecht auf den Querschnitt der Bezugsfläche (A) wirkt:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

In diesem Versuch galt bei nur geringer Deformation des zu prüfenden Körpers im Verhältnis zu seiner Größe das Hooksche Gesetz:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

Dabei war E der sogenannte Proportionalitätsfaktor zwischen der Normalspannung und Stauchung und er bezeichnete das Elastizitätsmodul (E). Das E -Modul beschreibt die Eigenschaften eines Materials unter elastischer Verformung, d.h. eine Verformung, die reversibel ist. Das Hooksche Gesetz ist gültig für isotrope, homogene und feste Körper, deren Spannungs-Dehnungs Diagramm eine lineare Funktion darstellt. Aus diesen Gründen diente nur der dem Nullpunkt am nächsten gelegene lineare Teil des Kraft-Weg Diagramms der Transplantate zur

Auswertung deren E-Moduls. Obwohl das Knorpelgewebe visco-elastische Qualitäten besaß, traf dieses nur auf eine bestimmte Phase der Druckbelastung zu. Es betraf die zweite Phase nach dem biphasischen Modell von V.C. Mow^{74,75}, die in diesem Experiment nicht erreicht wurde. Unter den vorliegenden Bedingungen war der Knorpel als homogener, isotroper Körper anzusehen.

Aus dem aufgezeichneten Kraft-Weg Diagramm war die Steifigkeit eines Transplantates zu ermitteln, indem man die Kraftänderung (ΔF) über die Längenänderung (ΔL) auftrug. Dabei blieb jedoch die Dicke des Transplantates und die Fläche, auf die die Kraft einwirkte, unberücksichtigt. Von diesen aber war die Steifigkeit abhängig. Die resultierende Zahl war also nicht unmittelbar mit den anderen Transplantaten vergleichbar. Bezog man diese Parameter jedoch mit ein, so resultierte das Elastizitätsmodul:

$$E - Modul = \frac{\frac{F}{\Delta L}}{\frac{A}{l}} (N / mm^2)$$

F Kraft (N)

A Fläche des Stempels (mm^2)

ΔL Längenänderung (cm)

l Dicke des Knorpels (mm)

Dieser Wert ist universell mit anderen Materialien vergleichbar.

Die maximale Versagenslast war in dem Experiment der Punkt, an dem das Transplantat der einwirkenden Kraft nachgab und einbrach. Es war die Stelle, an der eine definitive, nicht reversible, plastische Verformung des Knorpels stattgefunden hatte. Sie war als erstes Maximum von F im Kraft-Weg Diagramm abzulesen. Sie war ebenfalls abhängig von der Fläche, auf die die gemessene Kraft einwirkte. Um ein vergleichbares Maß zu erhalten, wurde die Versagensspannung ermittelt, indem die Fläche des Stempels miteinbezogen wurde:

$$\sigma_s = \frac{F_{max}}{A}$$

F_{max} Maximale Versagenslast (N)

σ_s Maximale Versagensspannung (N/mm^2)

A Fläche des Stempels (mm^2)

2.9.2 Aufbau der Materialprüfmaschine

Zur Messung diente die Materialprüfmaschine Zwick 1455. Der Kraftaufnehmer war eine Messdose, die bis maximal 500 N belastet werden konnte. Die maximale Krafteinwirkung wurde aber auf 150 N beschränkt, um einer Materialüberlastung vorzubeugen. Die Kraft wurde durch einen runden Stempel mit 4 mm Durchmesser ($=12,56 \text{ cm}^2$) übertragen. Diese Größe wurde gewählt, damit die Fläche im Vergleich zum gesamten Transplantat klein, aber dennoch groß genug war, damit kleine Unregelmäßigkeiten im Gewebe keinen Einfluß auf die Messung hatten.

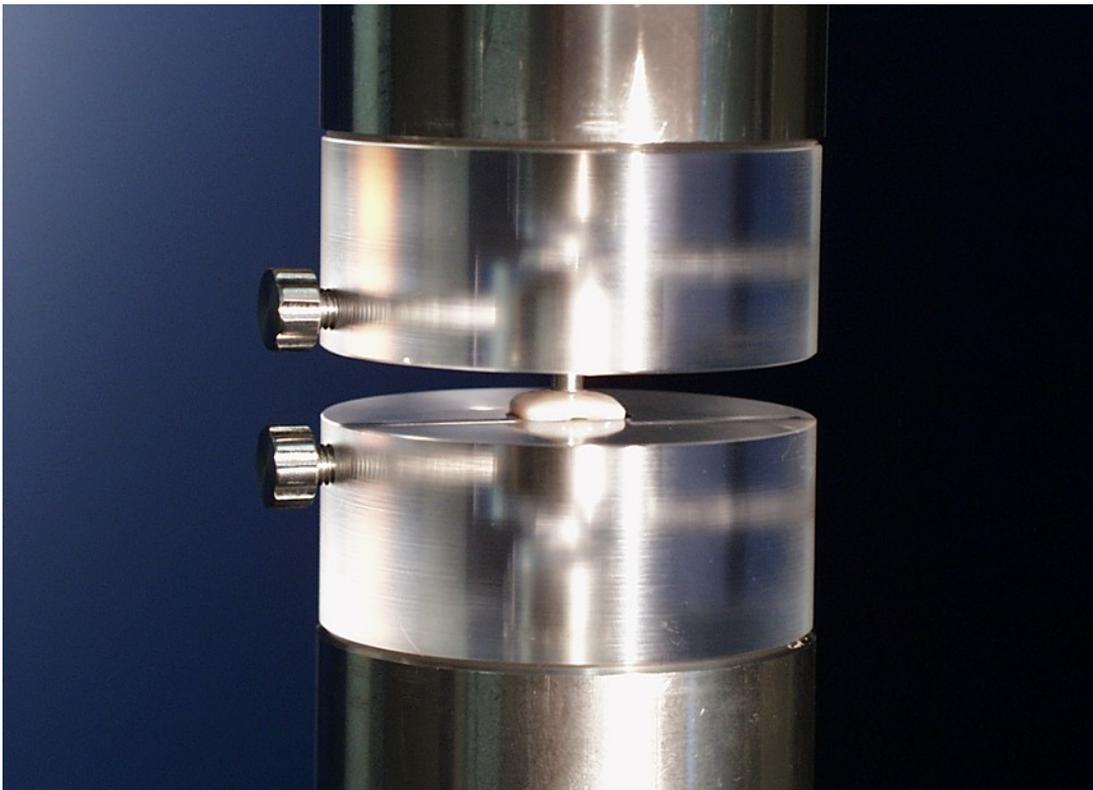


Abbildung 2: Meßdose der Zwick-Materialprüfmaschine mit Transplantat

2.9.3 Ablauf der biomechanischen Testung

Mit der Materialprüfmaschine wurde eine statische Prüfung durchgeführt. Im Normalfall ist dies ein Zug- und Druckversuch. Es fanden nur Druckversuche statt, da sie zusammen mit Scherkräften den physiologischen Belastungen von Knorpel eher entsprechen. Dabei wurde als erstes die Dicke des zu messenden Transplantates unter einer Vorspannung von 0,2 N gemessen.

Definierter Nullpunkt dazu war die Transplantatauflage bei einer Vorspannung von 1 Newton. Anschließend fuhr der Transplantathalter mit einer konstanten Geschwindigkeit (5 mm/min) dem Stempel entgegen, bis die Belastungsgrenze überschritten war.

Die Änderung der Kraft in Newton wurde in Abhängigkeit der zurückgelegten Strecke in Zentimeter aufgezeichnet und als Kraft-Weg Diagramm vom angeschlossenen Computer dargestellt. Da bei jedem Transplantat sein Versagen unter der Spannung festgestellt wurde und auch interstitielle Flüssigkeit während des Versuches ausfloss, konnte pro Exemplar nur ein Messzyklus durchlaufen werden.

2.10 Angewendete histologische Färbungen

Alle Knorpeltransplantate wurden in Formalinlösung fixiert, 5 µm dick auf dem Mykrometer zugeschnitten und zur morphologischen Beurteilung nach den standardisierten Verfahren der Abteilung für Pathologie des Rudolf-Virchow Klinikums, Charité-Standort Wedding angefärbt. Dabei wurden die folgenden drei Methoden verwendet:

1. Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)
2. Trichromfärbung nach Masson-Goldner (MG)
3. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)-Färbung

2.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 8.0. Da die vorliegende Stichprobenzahl nicht größer als 25 war und insgesamt drei Ausreißer des E-Moduls und einen Ausreißer der Versagenslast beinhaltete, war nicht von einer Normalverteilung der Werte auszugehen. Aus diesem Grunde wurde eine parameterfreie Testung mit dem Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5 Prozent festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Verlauf der Tierexperimente

Es wurden insgesamt 33 Transplantate in thymusaplastische Nacktmäuse implantiert. Während des Versuchsablaufs starb eine Maus. Die zwei Transplantate dieses Tieres wurden nicht verwendet. Nach sechs Wochen konnten 14 TE Knorpel-Exemplare explantiert werden. Nach insgesamt zwölf Wochen wurden weitere 17 Exemplare explantiert. Eines der 17 Transplantate zeigte eine starke Verminderung seiner Substanz mit dem Verlust seiner Form. Dieses Transplantat konnte nicht zur mechanischen Auswertung verwendet werden.

Eine Kontrollgruppe mit einem dritten Transplantat aus den Trägermaterialien Vlies und Fibrinkleber ohne Chondrozyten wurde nicht verwendet. Die Ergebnisse bisheriger Versuche mit dem Ethisorbvlies ohne vitale Komponenten hatten die zu erwartende Resorption des resorbierbaren Materials nachgewiesen^{59,60,76}. Zusätzlich war die Anzahl der zu Verfügung stehenden Versuchstiere begrenzt. Aus diesen Gründen wurde auf ein avitales drittes Transplantat verzichtet.

3.2 Makroskopischer Aspekt nach Explantation

Die Transplantate waren in der Subkutis der Nacktmäuse von reaktivem Bindegewebe umwachsen, aus dem sie während der Explantation leicht befreit werden konnten. Nach der Explantation zeigten 30 der insgesamt 31 Transplantate keine Veränderungen ihrer ursprünglich quadratischen Form. Die Oberfläche war weisslich, glatt, leicht spiegelnd und die Konsistenz fest-elastisch. Makroskopisch konnte kein Unterschied zwischen der 6-Wochen- und der 12-Wochen-Gruppe festgestellt werden.

| | TE Knorpel 6 Wochen | TE Knorpel 12 Wochen | Nativer Septumknorpel |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Anzahl N= | 14 | 17 | 25 |
| Mittelwert der Dicke in mm | 1,66 | 1,71 | 2,33 |
| Standard-abweichung | 0,17 | 0,44 | 0,98 |
| Resorption | 0 | 1 | entfällt |
| Persistenz der vorgebenen Form | 14 | 16 | entfällt |

Tabelle 1: Zusammenfassung der makroskopischen Aspekte

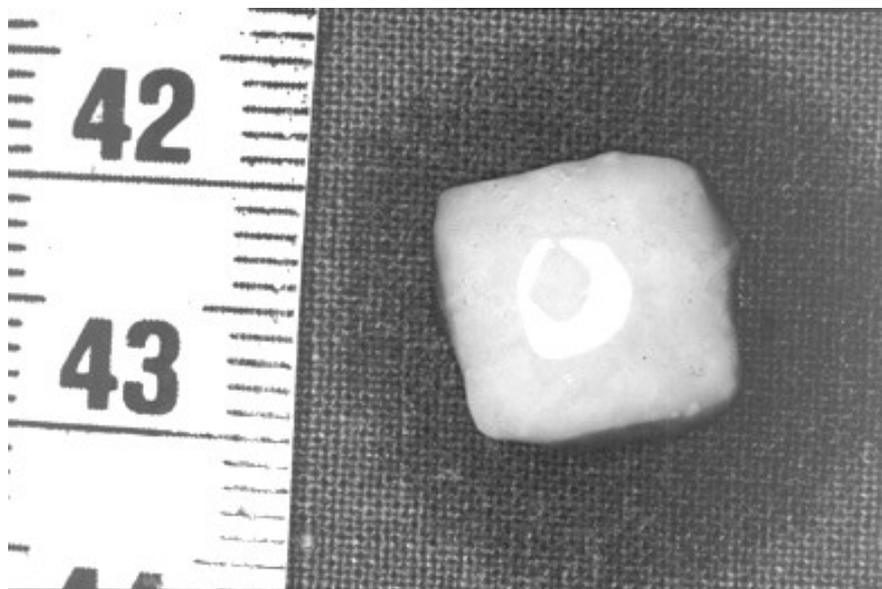


Abbildung 3: makroskopischer Aspekt eines Transplantates nach 12 Wochen

3.3 Histologische Untersuchung

3.3.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)

In dieser Übersichtsfärbung zeigte die histologische Untersuchung der Transplantate ein knorpelähnliches, deutlich strukturiertes Gewebe. In den beiden TE Versuchsgruppen waren rundliche Chondrozyten mit einem bläulichen Zellkern erkennbar, die von einem Knorpelhof umgeben waren. Die die Zellen einbettende rötliche Matrix war homogen aber amorph, da sich in der HE-Färbung weder das Geflecht der verschiedenen Kollagenfasern, noch die Mukopolysaccharide darstellen ließen.

Eine dünne Schicht von fibrösem Gewebe umgab den Neoknorpel. Diese feine, faserige Schicht stellte eine Pseudokapsel dar, die durch eine Verquickung des Neoknorpels mit der reaktiven Bindegewebsbildung in der Maus erklärbar ist. Diese Schicht wurde deshalb nicht als Analogon zum stratum fibrosum des Perichondriums gesehen.

Zu den Transplantatgrenzen hin lagen die Zellen dichter und flachten stark ab. Morphologisch stellte sich eine zunehmende Differenzierung der Chondrozyten von aussen nach innen dar. Das ganze Knorpelstück war von einer klar abgegrenzten, dünnen Zellschicht umgeben, dem stratum cellulare des Perichondriums vergleichbar, jedoch mit einer ausgeprägteren Schichtdicke.

Im Vergleich der 6-Wochen- und der 12-Wochen-Gruppe bot sich nach zwölf Wochen ein homogeneres histologisches Bild als nach sechs Wochen. Die nach sechs Wochen noch heterogenen Zellkerne zeigten sich nach zwölf Wochen regelrecht strukturiert. Im Gegensatz zum TE Knorpel war im nativen Nasenseptumknorpel an Stelle der Pseudokapsel die Schleimhautauflage zu sehen. Die Verteilung des Matrix- und des Chondrozytenanteils war bei der 12-Wochen-Gruppe dem Nativknorpel ähnlich und bei der 6-Wochen-Gruppe deutlich zu Gunsten der Zellzahl verschoben, mit kompakterem Zytoplasma und niedrigerem interzellulären Abstand.

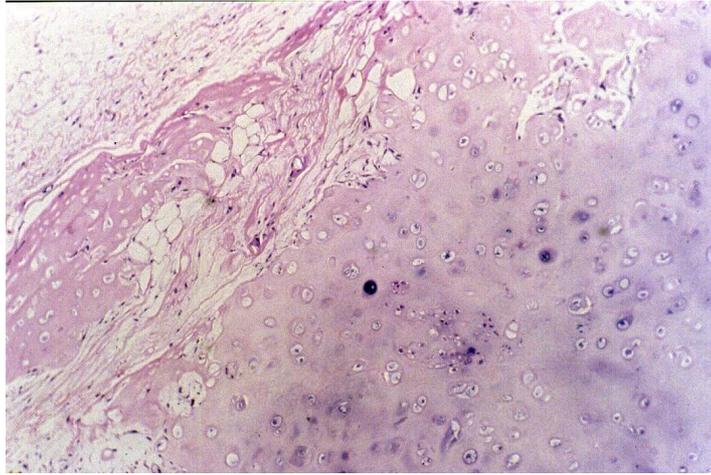


Abbildung 4: Nativer Septumknorpel HE 200x

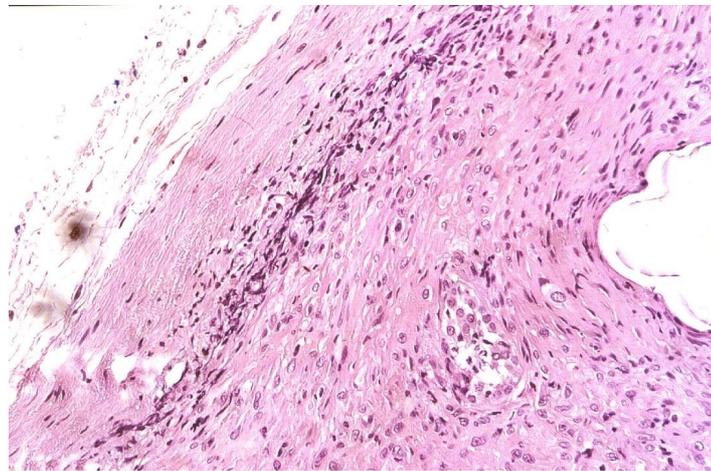


Abbildung 5: TE Knorpel 6-Wochen-Gruppe HE 200x

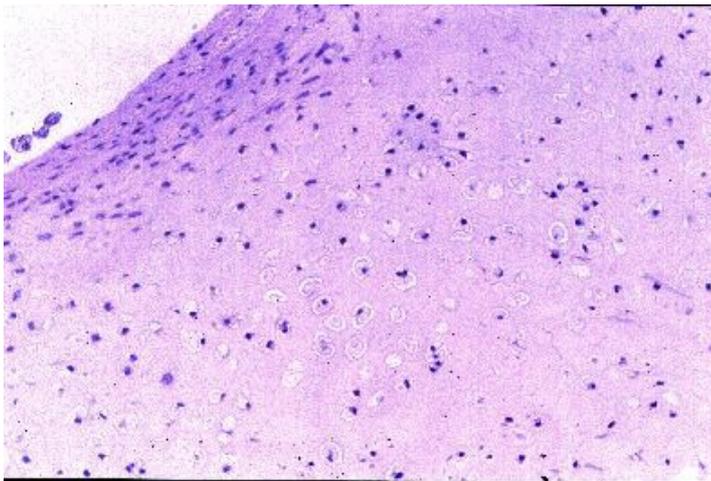


Abbildung 6: TE Knorpel 12-Wochen-Gruppe HE 200x

3.3.2 Masson-Goldner-Färbung (MG)

Mit der Trichromfärbung nach Masson-Goldner konnte die Präsenz von Kollagen in dem TE Knorpel nachgewiesen werden. Das Kollagen stellte sich als dunkelblaue Streifen, die Lakunen umgebend, innerhalb der Matrix dar. Kollagen war in allen Gruppen nachweisbar.

Die Matrix wurde blau-grün angefärbt, was die Präsenz von Mukosubstanzen widerspiegelte. Im Vergleich der beiden TE Knorpel-Gruppen lagen die Zellen nach sechs Wochen isoliert und leicht heterogen in die Matrix eingebettet und formten nach zwölf Wochen die sogenannten Lakunen mit der Konfluenz der einzelnen Knorpelhöfe in kleine Gruppen von zwei bis vier Chondrozyten. Diese Territorien wurden durch interterritoriale Grundsubstanz voneinander getrennt. Im Transplantat nach zwölf Wochen lagen die Zellen gleichmäßig im Raum verteilt, wiesen aber eine insgesamt höhere Zelldichte und ein inhomogeneres Bild auf als nativer hyaliner Knorpel.

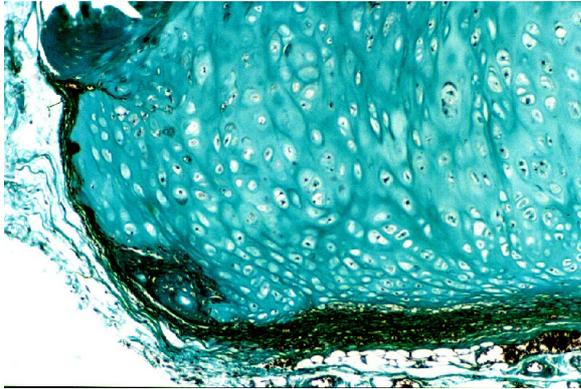


Abbildung 7: Nativer Knorpel MG 100x

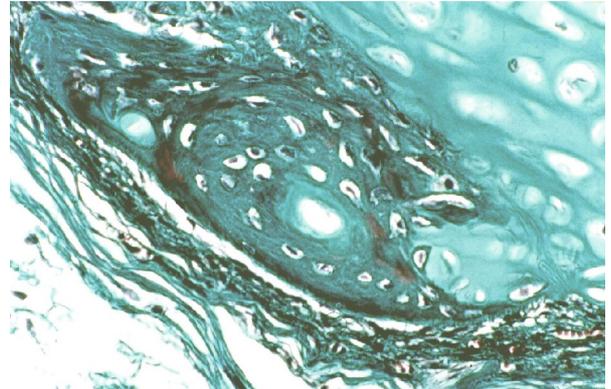
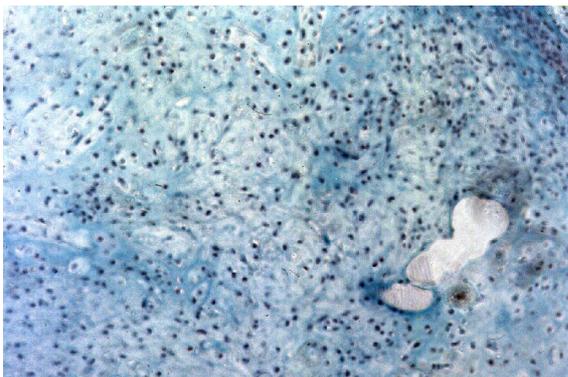
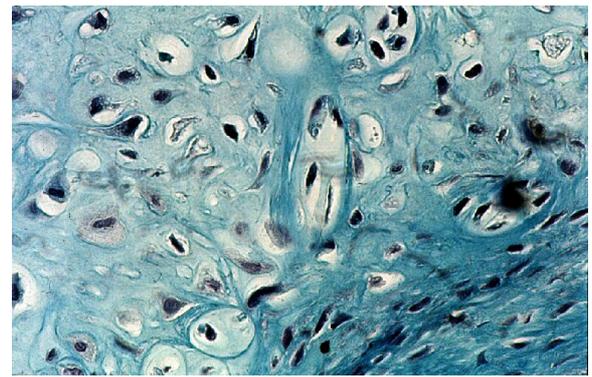


Abbildung 10: Nativer Knorpel MG 400x



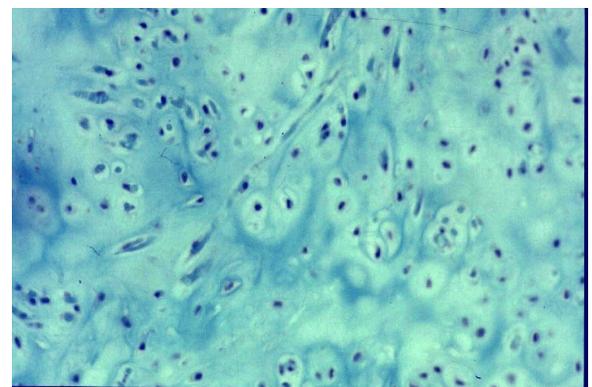
**Abbildung 8: 6-Wochen-Gruppe MG
100x**



**Abbildung 11: 6-Wochen-Gruppe MG
400x**



**Abbildung 9: 12-Wochen-Gruppe MG
100x**



**Abbildung 12: 12-Wochen-Gruppe MG
400x**

3.3.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Die PAS Färbung diente dem Nachweis von Mukopolysacchariden, wie z.B. Hyaluronsäure, Keratansulfat und Chondroitinsulfat, die sich nach dieser Methode rot anfärben. Die Mukopolysaccharide sind ein wichtiger Bestandteil des Knorpelgewebes und beeinflussen wesentlich seine biomechanischen Qualitäten. In der 6-Wochen-Gruppe war eine zart-rote Farbaufnahme der Transplantate von aussen nach innen zunehmend zu erkennen. Die histologischen Schnitte der 12-Wochen-Gruppe zeigten eine deutliche Rotfärbung, ebenfalls von aussen nach innen zunehmend.

Auf den Schnittflächen der Transplantate waren einige Aussparungen ganz ohne Zellen, Zytoplasma oder Matrix zu sehen. Es handelte sich dabei um die Lokalisationen, an denen die Fasern des ungewebten Vlieses ihre Kontaktstellen hatten. Da die Fasern innerhalb weniger Wochen resorbiert wurden, waren keine Überreste mehr von diesen zu erkennen.

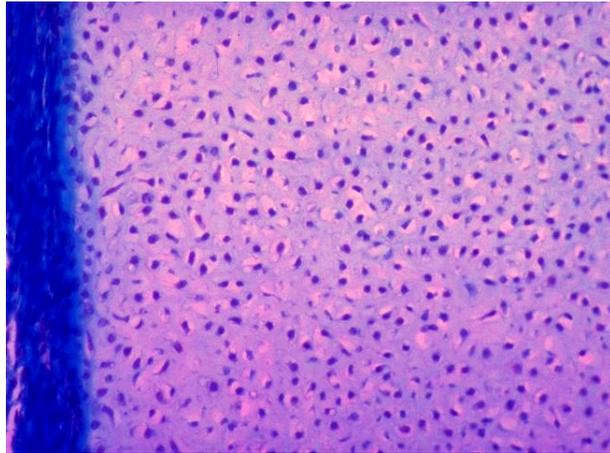


Abbildung 13: Nativer Knorpel PAS 200x

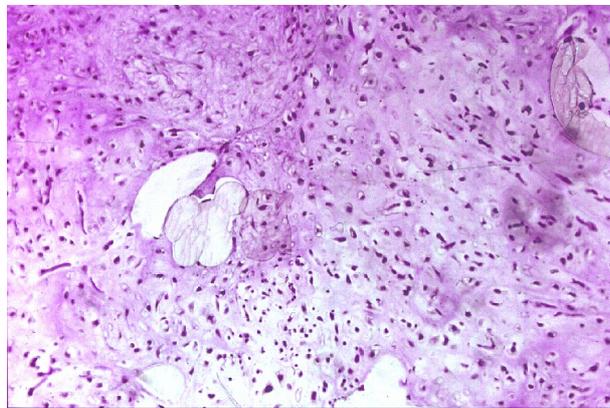


Abbildung 14: 6-Wochen-Gruppe PAS 200x

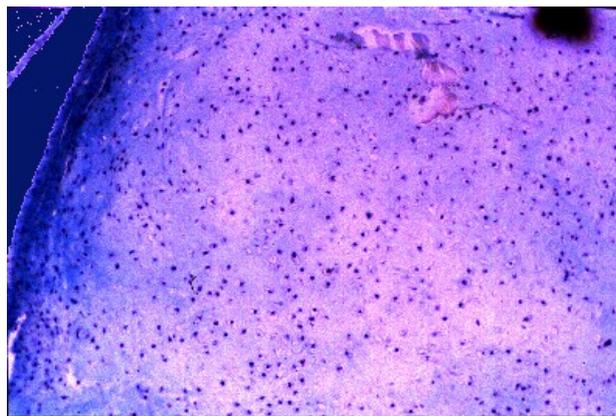


Abbildung 15: 12-Wochen-Gruppe PAS 200x

3.3.4 Zusammenfassung der wichtigsten histologischen Eigenschaften

| | TE Knorpel 6-Wochen | TE Knorpel 12-Wochen | Nativer Septumknorpel |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Anzahl N= | 14 | 17 | 25 |
| Vitales Gewebe | 14 (100 %) | 16 (94,1 %) | 25 (100 %) |
| Produktion von Mukosubstanzen | + | ++ | ++ |
| Nachweis von Kollagen (unspezifisch) | + | + | + |
| Zellredifferenzierung | +/- | + | entfällt |
| Resorption | 0 (0 %) | 1 (5,9 %) | entfällt |
| Persistenz der vorgebenen Form | 14 (100 %) | 16 (94,1 %) | entfällt |

Legende: -keine; +/- wenig; + deutlich; ++ stark

Tabelle 2: Übersicht der histologischen Eigenschaften der Transplantate

3.4 Biomechanische Testung

3.4.1 Versagensspannung

Hier ist ein Kraft-Weg Diagramm abgebildet, wie es aus den Messungen mit der Materialprüfmaschine resultierte. Dieses soll exemplarisch dazu dienen, den Vorgang der Auswertung zu verdeutlichen.

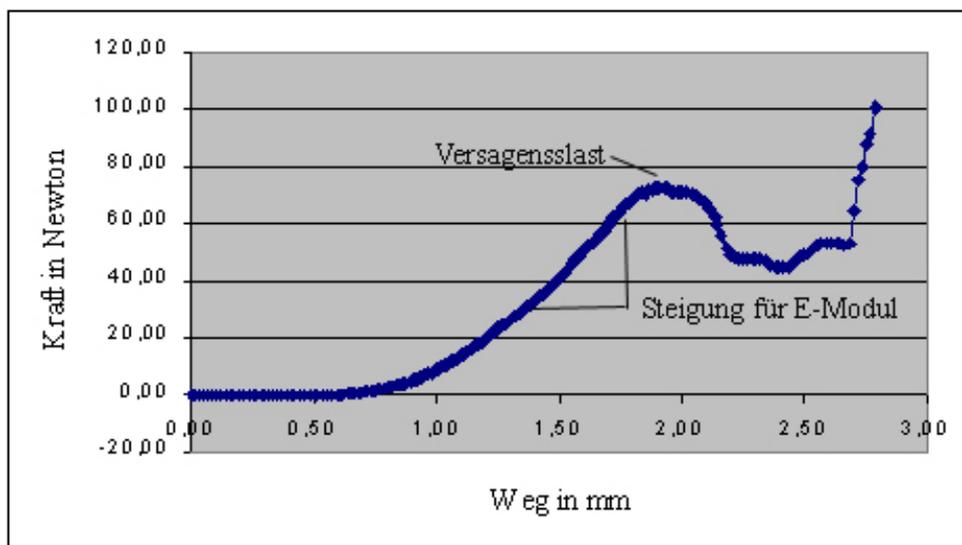


Abbildung 16: exemplarische Ergebnisdarstellung

3.4.2 Kruskal-Wallis Test

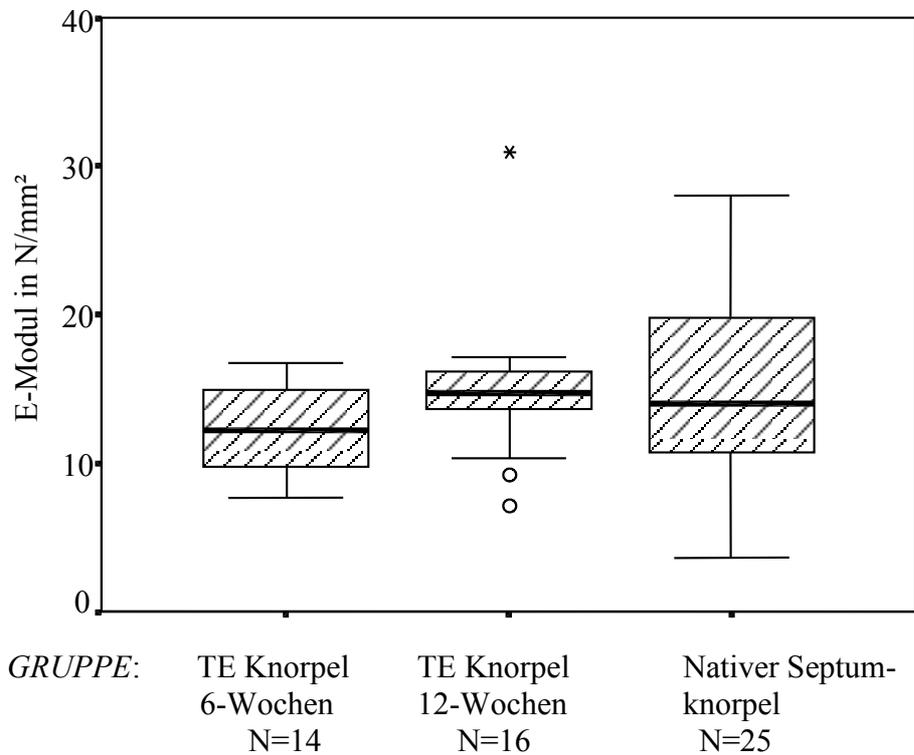
Hier sind die Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test dargestellt. Dies ist ein Rangtest für unverbundene Stichproben.

| GRUPPE | Anzahl N | Mittlerer Rang |
|----------------|----------|----------------|
| E-Modul 1 | 14 | 21,07 |
| E-Modul 2 | 16 | 30,88 |
| E-Modul 3 | 25 | 30,04 |
| E-Modul Gesamt | 55 | entfällt |
| Versagens-1 | 13 | 26 |
| spannung 2 | 15 | 27,4 |
| 3 | 25 | 27,28 |
| Gesamt | 53 | entfällt |

Tabelle 3: Rangtest aller drei Gruppen

| | E-Modul | Versagensspannung |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|
| Chi-Quadrat | 3,54 | 0,07 |
| df | 2 | 2 |
| Asymptotische Signifikanz | 0,17 | 0,96 |

Tabelle 4: Statistik für Kruskal-Wallis-Test und Gruppenvariable

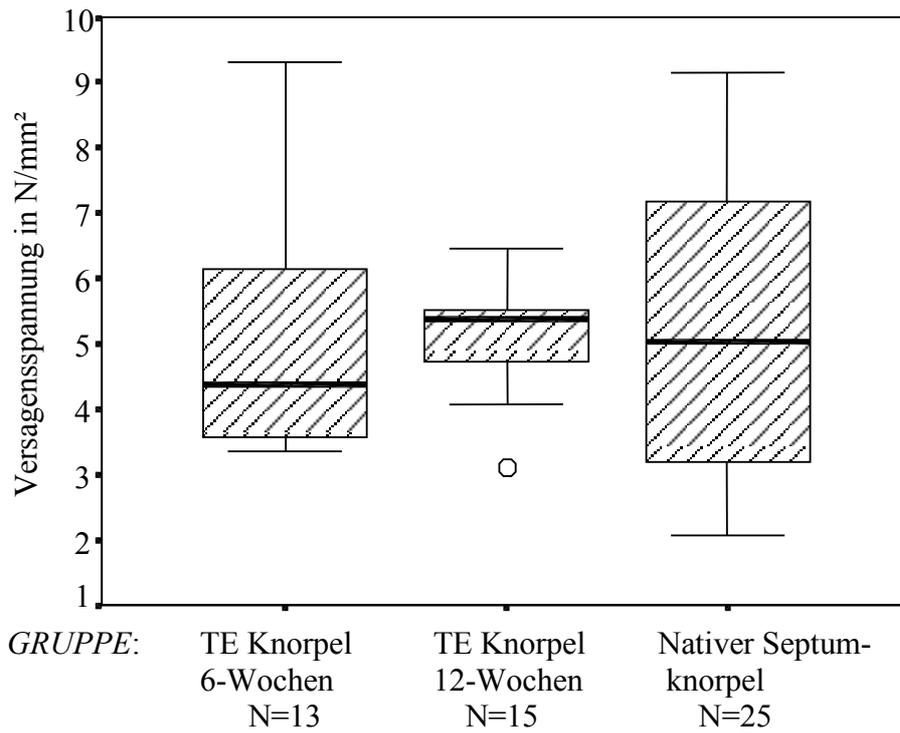


(Ausreißer sind durch * nach oben und **O** nach unten gekennzeichnet)

Graphik 2: Boxplot Ergebnisse E-Modul aller Gruppen

| | TE Knorpel 6-Wochen | TE Knorpel 12-Wochen | Nativer Septumknorpel |
|---|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Anzahl N= | 14 | 16 | 25 |
| E-Modul Mittelwert in N/mm² | 12,06 | 14,99 | 15,69 |
| E-Modul Standard- abweichung | 3,04 | 5,09 | 7,27 |

Tabelle 5: Statistische Auswertung E-Modul



(Ausreisser sind durch **O** gekennzeichnet)

Graphik 3: Boxplot Ergebnisse Versagensspannung aller drei Gruppen

| | TE Knorpel 6-Wochen | TE Knorpel 12-Wochen | Nativer Septumknorpel |
|---|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Anzahl N= | 13 | 15 | 25 |
| Versagensspannung Mittelwert in N/mm² | 5,09 | 5,12 | 5,31 |
| Standardabweichung | 1,79 | 0,85 | 2,16 |

Tabelle 6: Statistische Auswertung der Versagensspannung

4 Diskussion

4.1 Beurteilung des TE Knorpel Herstellungsverfahrens

4.1.1 Chondrozytenisolierung und Zellamplifikation

Die Methode der Zellisolierung aus Nasenseptumknorpel lieferte konstante Ergebnisse. Die Vitalitätsprüfung der isolierten Chondrozyten ergab stets einen Anteil der geschädigten Zellen von unter 10 %, d.h. über 90 % wurden vital aus ihrer Gewebematrix gelöst. Die Verunreinigung durch Bindegewebsfibroblasten konnte durch die vorhergehende manuelle Entfernung von adhärierendem Gewebe verhindert werden.

Während der Phase der Amplifikation konnte die Anzahl der Knorpelzellen über fünftausendfach erhöht werden. In der vergleichbaren Literatur sind Angaben einer Vermehrung um den Faktor 1000 bis maximal einer Millionen^{57,77} zu finden. Eine unbeschränkte Vermehrung in vitro ist also nicht zu erwarten⁷⁸. In der Praxis bedeutet dies, daß aus einem kleinen Stück Knorpel der Nasenscheidewand, wie er etwa bei einer Nasenseptumplastik anfällt, ein TE Knorpel hergestellt werden kann, der um ein Vielfaches größer ist. Die begrenzte Ausgangsmasse des vorhandenen, zur Entnahme geeigneten, körpereigenen Knorpels würde bei der Anwendung des TE Knorpels für die meisten Patienten zu einer mittleren Rekonstruktion ausreichen.

4.1.2 Kritische Betrachtung der verwendeten TE Herstellungsmethode

Bei der in Kapitel 2 beschriebenen Methode zur Herstellung von TE Knorpel handelte es sich um einen Fabrikationsprozess mit vielen manuellen, arbeitsintensiven Schritten. Aufgrund des Aufwands der Methode, konnte nur eine begrenzte Zahl von Transplantaten hergestellt werden. Zwischen der Entnahme der Knorpelbiopsie und dem implantierbaren TE Knorpel vergingen drei bis vier Wochen. Bei einer nicht geplanten Operation, wie etwa die Rekonstruktionen in der Unfallchirurgie, wäre das TE Transplantat erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Akutphase verfügbar.

Sollten die TE Gewebe in die Phase der klinischen Erprobung kommen, wäre eine Umstellung auf patienteneigenes Serum zur in vitro Amplifikation anzuraten. Dieses bedeutet zwar eine Mehrbelastung für den Patienten, erzielte aber ähnlich gute Proliferationsraten der in vitro Kultur⁷⁹. Bei der Verwendung fötalen Kälberserums kann es zu nicht vorhergesehenen, immunologischen Reaktionen kommen. Des weiteren ist eine Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) nicht vollkommen ausgeschlossen. Die immunologischen

Reaktionen des Transplantatempfängers sind bisher noch nicht ausreichend erforscht worden und bedürfen einer intensiven Abklärung vor einer klinischen Anwendung von TE Knorpel.

Im Gegensatz zu vielen vorhergehenden Studien mit nicht amplifizierten Tierchondrozyten und in vitro Modellen, handelte es sich bei der angewendeten Methode um humane Zellen, die erst vermehrt und dann in ein in vivo Modell transplantiert wurden.

Abschließend konnte die verwendete Methode trotz ihres Arbeitsaufwandes als geeigneter Prozess zur Herstellung von transplantationsfähigem, knorpelähnlichen Gewebe gewertet werden. Die Verwendung von Nasenseptumchondrozyten zeigte sich als mögliche, mit gewissen Einschränkungen verbundenen Quelle zur Gewinnung des Ausgangsmaterials für derartige Transplantate.

4.2 Biomechanische Messung

4.2.1 Vor- und Nachteile des verwendeten Messverfahrens

Das in Kapitel 2 dargestellte hoch standardisierte Messverfahren wurde erfolgreich als ein geeigneter Ansatz verwendet, um die Stabilität des Neoknorpels im Hinblick auf einen klinischen Einsatz zu bestimmen. Ein Zugverfahren⁵⁸ wurde nicht verwendet, da es nicht seiner physiologischen Belastung in situ entspräche. Das vorliegende Messverfahren zeigte sich in Vorversuchen als ausreichend empfindliche Methode, um Knorpel verschiedener Lokalisationen signifikant unterscheiden zu können und signifikante mechanische Unterschiede zwischen Sechs- und 12-Wochentransplantaten aus bovinem TE Knorpel darzustellen⁶⁰.

Nach dem biphasischen Modell von Mow⁶⁰ gibt es zwei Stadien, die bei der Knorpelbelastung auftreten. In der ersten Phase tritt durch die einwirkende Kraft die im Knorpel gebundene interstitielle Flüssigkeit aus, um dann in der zweiten Phase, der Entlastung, wieder resorbiert zu werden. Die Reabsorption setzt jedoch voraus, daß die Struktur des Knorpels nicht vom Druck zerstört worden ist.

Der verwendete Drucktest bestimmte verlässlich die erste Phase dieses Modells und den Punkt, an dem die Gewebestruktur des Knorpels eine nicht reversible Verformung erfuhr. Die Rückresorption der interstitiellen Flüssigkeit wäre danach gestört gewesen und fand deshalb als Teil der zweiten Phase nach Mow keinen Eingang in die vorgenommenen Messungen. Aus diesem Grunde war es nicht nötig, den Knorpel während der hier verwendeten Messungen in einer isotonen Nährlösung zu lagern⁵⁹. Die gewonnenen Daten über die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels spiegelten somit nur bedingt die in situ Verhältnisse von

Gelenkknorpel mit wiederholter Be- und Entlastung wider.

Sollte der Tissue engineering Knorpel weitere Verbreitung finden, so wäre das verwendete Testverfahren mit seinem unkomplizierten Aufbau und seiner hohen Reproduzierbarkeit ein geeignetes Verfahren, um den Qualitätstandard des TE Knorpels zu überprüfen.

4.2.2 Evaluation der gemessenen biomechanischen Werte

Die mit dieser Messmethode gewonnenen Ergebnisse konnten eindeutig nachweisen, daß bei den getesteten biomechanischen Werten zwischen den drei Gruppen, humaner Septumknorpel, 6-Wochen-Gruppe und 12-Wochen-Gruppe kein signifikanter Unterschied bestand. Weder im Elastizitätsmodul ($p=0,170$), noch bei der Versagensspannung ($p=0,964$) war eine signifikante Differenz zwischen Tissue engineering Knorpel und nativem Nasenseptumknorpel festzustellen. Diese Aussage traf ebenfalls auf beide TE Knorpel-Gruppen zu, die sich auch untereinander nicht signifikant unterschieden.

Die gemessenen Werte des E-Moduls des nativen Septumknorpels von 7,6 bis 16,8 N/mm² als Referenzgruppe waren tiefer, als die Angaben mit 12,8 bis 22,5 N/mm² in der verfügbaren Literatur⁸⁰. Erwartungsgemäß lagen die Ergebnisse dieser Arbeit für die native Kontrollgruppe deutlich unter den Literaturangaben für nativen Gelenkknorpel, dessen Werte mit über 20 N/mm² angegeben wurden^{81,82}.

Die Streuung der Messwerte des Neoknorpels waren geringer als die der nativen Gruppe, was auf ein qualitativ hochwertiges Gewebe und eine bereits gute Standardisierung in der Produktion von Neoknorpel mit Tissue engineering hinwies.

Die bisherigen Studien, die TE Knorpel auf seine mechanischen Eigenschaften untersucht hatten, zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. Während die einen von signifikant schlechteren mechanischen Eigenschaften des TE Knorpels berichteten^{58,59,60,83,84}, entsprachen andere den hier dargestellten Ergebnissen mit einem TE Knorpel, der sich nicht signifikant von der nativen Kontrollgruppe unterschied^{59,60,60}. Eine Erklärung für diese Diskordanz der gemessenen biomechanischen Eigenschaften des TE Knorpels können die verschiedenen Quellen der Chondrozyten mit und ohne Amplifikation, als auch die verschiedenen Transplantationsmodelle der Versuche bieten.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode mit humanen Septumchondrozyten und einem in vivo

Transplantationsmodell in einer immuninkompetenten Nacktmaus stellten die idealen Bedingungen für eine physiologische Knorpelreifung dar. Handelt es sich jedoch um einen immunkompetenten Empfänger, so ist eine weniger ausgeprägte Reifung des TE Knorpels mit fibrotischem Einwuchs in das Transplantat mit verminderten biomechanischen Qualitäten zu erwarten.

4.3 Tissue engineering Knorpel und nativer Knorpel im Vergleich

Die makroskopische und histologische Untersuchung des Tissue engineering Knorpels zeigte sowohl nach sechs als auch nach zwölf Wochen Strukturen, die dem des normalen hyalinen Knorpels ähnlich waren. Die Transplantate der 12-Wochen-Gruppe schienen sowohl in ihrer Zellanordnung, als in der Matrixbildung differenzierter und ausgereifter als die der 6-Wochen-Gruppe. Diese Differenz wurde nicht quantifiziert. Der vergrößerte Abstand der Chondrozyten kann auf einer vermehrten Matrixproduktion in der längeren Zeitspanne beruhen, ist aber auch durch einen Zelluntergang der Chondrozyten erklärbar. Die in Kapitel 3.3.1 beschriebene Pseudo-Kapsel, die sich in vivo gebildet hatte, führte möglicherweise zu einer Verschlechterung der Diffusion zum Transplantatinneren und damit zu einem partiellen Zelluntergang. Die Implantation in eine subkutane Tasche auf dem Rücken einer Nacktmaus könnte durch die ständige Bewegung der Maus als eine leichte mechanische Stimulation auf die Transplantate gewirkt und somit über die längere Zeit einen zusätzlichen positiven Einfluß auf die Entwicklung des Knorpels ausgeübt haben^{85,86}.

Im histologischen Vergleich mit der nativen Kontrollgruppe fiel eine höhere Zelldichte des TE Knorpels mit einer inhomogeneren Chondrozytenverteilung auf. Dieses entsprach den beschriebenen Beobachtungen aus anderen TE Nacktmausmodellen^{59,87,88,89}.

Die histologischen Ergebnisse konnten in keinen Zusammenhang mit den biomechanischen Eigenschaften gebracht werden. Die Beziehung von histologischen Eigenschaften und biomechanischen Qualitäten von Knorpel wird in der Literatur als widersprüchlich beschrieben^{90,91}. Die mechanischen Eigenschaften beruhen auf unzähligen Einzelfaktoren, die nicht alle mit der histologischen Analyse erfasst werden. Im Literaturvergleich zum TE Knorpel konnte in einer vorhergehenden Studien ebenfalls keine Korrelation zwischen histologischem Erscheinungsbild und mechanischen Eigenschaften des TE Knorpels hergestellt werden⁶¹.

Zu der Frage, welche die geeignetste Implantationszeit sei, konnte abschließend nur eine tendenzielle Antwort gegeben werden. Aus der Tatsache, daß sich die 6-Wochen-Gruppe nicht signifikant von der 12-Wochen-Gruppe unterschied, läßt sich schließen, daß der entstandene

Knorpel auch schon nach sechs Wochen belastbar ist. Unter Berücksichtigung der histologischen Ansicht, die nach zwölf Wochen einen ausdifferenzierteren Knorpel zeigte als nach sechs Wochen, schienen zwölf Wochen vor einer Belastung des Transplantates empfehlenswert. Ein weiteres Argument für die 12-Wochen-Gruppe war die Degenerationszeit der verwendeten Vliesfasern. Normalerweise dauert deren Abbau nur wenige Wochen. Die Degenerationszeit der Vliese war jedoch multifaktoriell bestimmt^{92,93}, und konnte deshalb abhängig von dem vorherrschenden Milieu erheblich variieren. Solange noch Vliesfasern vorhanden, war das Infektionsrisiko erhöht. Dieses wurde durch die Senkung des pH-Wertes des Gewebes bei der Vliesresorption hervorgerufen. Die Fasern selbst konnten noch dazu als Fremdkörper wirken.

Um die Fremdkörperreaktion des Transplantatträgers auf die Vliesfasern zu vermeiden, wurden auf alle der gemessenen Transplantate eine zweite Schicht des Fibrinkleber-Zellgemisches nach ihrem Aushärten aufgetragen. Diese zweite Schicht, eine Art Kapsel, umschloß die exponierten Stellen, an denen das Transplantat auflag oder an der noch einzelne Vliesfasern aus dem Polymer-Zell-Konstrukt herausragten. Wie die Ergebnisse zeigten, reiften, unter Ausschluß der verstorbenen Maus, von den insgesamt 31 Transplantaten nur eines nicht zu dem erwarteten Neoknorpel heran. Dieses erträgliche Maß an Resorption rechtfertigte den Mehraufwand an Zeit und den Mehrbedarf an benötigten Zellen für die Kapsel.

4.4 Ausblick und Perspektiven

Der klinische Einsatz des durch Tissue engineering hergestellten Knorpels scheint in der nahen Zukunft zu liegen. Es konnte nach der beschriebenen Methode ein knorpelähnliches Gewebe mit vergleichbaren biomechanischen Qualitäten des Nasenseptumknorpels hergestellt werden. Bezüglich des biomechanischen Verhaltens steht dem Einsatz von TE Knorpel als Ersatzmaterial bei plastisch-rekonstruktiven Operationen im HNO- und kieferchirurgischen Bereich nichts mehr im Wege. Für eine Produktion von TE Knorpel in größeren Mengen wurden schon einige Verfahren wie zum Beispiel eine Perfusionkammer^{59,60} entwickelt, um den Herstellungsprozess zu vereinfachen. Um ein langfristig befriedigendes Ergebnis zu erzielen, müssen noch die metabolischen Abläufe mit ihren regulierenden Faktoren optimiert werden⁵⁸. Die größten Bedenken, die vor einer klinischen Anwendung ausgeräumt werden müssen, bestehen aus immunologischer Sicht. Obwohl es sich um eine autologe Transplantation handelt, ist eine Immunreaktion auf das Transplantat nicht auszuschließen. Günstig wirkt sich aus, daß die Chondrozyten a priori nicht in humoralen Kontakt mit dem Empfänger kommen, da sie von der kompakten extrazellulären Matrix umgeben werden. Es konnte jedoch bei einigen Patienten mit

autologen Transplantaten eine Antikörperbildung gegen die Kollagene Typ IX und XI nachgewiesen werden⁹⁴, die zur Absorption des Transplantates geführt hatten. Das Risiko absorbiert zu werden, ist dabei für den nativen Knorpel aber genauso groß, wie für den Neoknorpel und somit ebenso vertretbar, wie bei jeder herkömmlichen autologen Transplantation.

Das angewandte dreidimensionale Kultursystem ist ebenfalls als Forschungskonstrukt geeignet, um daran die Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis zu untersuchen. Ein ähnlicher Versuchsaufbau existiert als sogenanntes Pannusmodell⁹⁵. Neue Kombinationen mit Gen- und Stammzellentherapie könnten sich als sinnvoll erweisen⁹⁶. Das entstandene Knorpelgewebe könnte nicht nur klassisch dort eingesetzt werden, wo nativer Knorpel ersetzt werden muß, sondern es sind auch andere Anwendungen denkbar. Der Knorpel kann als Barriere zum Schutz anderer transplantierte Zellen dienen, so z.B. zur Protektion isolierter Langerhans-Inseln in der Therapie von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I⁹⁷. In Bezug auf die mechanische Stabilität des Knorpelgewebes, ist sein Einsatz auch als Shuntmaterial denkbar⁹⁸.

Die klinische Anwendung von Tissue engineering Knorpel brächte noch andere Potentiale mit sich, die den Bestrebungen nach einer effizienteren Medizin gerecht würden. Die Technik ist unabhängig vom Alter des Patienten^{62,99}. Das Transplantatmaterial wurde außerhalb des Körpers gezüchtet und vermehrt, wodurch ein größerer traumatischer Eingriff beim Patienten vermieden werden kann¹⁰⁰. Der Neo-Knorpel konnte sogar in einigen Modellen ohne Inzision mittels Injektion appliziert werden^{101,102,103}. Mit der Tissue engineering Technik kann potentiell die Morbidität verringert, der Patient geschont, chirurgischer Aufwand gespart und lange postoperative Liegezeiten verhindert werden. Die Transplantate würden nach Maß¹⁰⁴ angefertigt, je nach Bedarf des zu deckenden Defektes, und böten so eine optimierte Versorgung des Patienten, die weniger Nachsorgekosten entstehen liessen. Mit einer Weiterentwicklung des Tissue engineering wäre es also möglich, die Lebensqualität zu verbessern und gleichzeitig die Kosten zu senken.

5 Zusammenfassung

In der Medizin gibt es einen großen Bedarf an Knorpelersatz, der durch bisherige Verfahren nicht zufriedenstellend gedeckt werden kann. Die autologe Transplantation ist die verbreitetste Technik, wird aber durch das geringe Material, das zu Verfügung steht, stark eingegrenzt. Andere Methoden bergen unerwünschte Risiken wie Infektion oder Abstoßungsreaktion. Einen Ausweg könnte in vitro hergestellter, autologer Knorpel bieten, der mit den Erkenntnissen des Tissue engineering aus einer Patientenbiopsie hergestellt wird.

Das Ziel dieser Dissertation war es, die biomechanischen Eigenschaften von in vitro hergestelltem und in vivo gereiftem Knorpel denen des nativen, hyalinen Knorpels und seinen klinischen Anforderungen gegenüberzustellen.

Humane Chondrozyten wurden enzymatisch aus Nasenseptumknorpel isoliert und in Monolayerkultur vermehrt. Mit kommerziellem Fibrinkleber wurden die Zellen in einem vollresorbierbaren Polymer-Vlies gleichmäßig dreidimensional verteilt, fixiert und mechanisch stabilisiert. Nach der Auspolymerisierung wurde eine Kapsel mit einer etwas dünneren Zellsuspension und Fibrinkleber um das Zell-Polymer Konstrukt aufgetragen. Die so entstandenen Transplantate (n= 33) wurden in die Subkutis von Nacktmäusen implantiert. Eine Maus mit zwei Implantaten verstarb frühzeitig. In der ersten Gruppe (n= 14) wurde der Tissue engineering Knorpel nach sechs Wochen, in der zweiten Gruppe (n= 17) nach zwölf Wochen explantiert. Von beiden Gruppen des Neoknorpels wurden mittels eines standardisierten Drucktestes die Versagensspannung und das Elastizitätsmodul bestimmt. Nativer Nasenseptumknorpel diente dabei als Referenzgruppe. Anschließend wurden die getesteten Gewebestücke histologisch untersucht.

Die Chondrozyten hatten sich in vivo redifferenziert und knorpeltypische Matrix synthetisiert. Das neu gebildete Gewebe zeigte dem hyalinen Knorpel ähnliche makroskopische und histologische Charakteristika. Die Gruppe nach zwölf Wochen hatte die Erscheinung eines differenzierteren Gewebes als nach sechs Wochen.

Die mit dieser Messmethode gewonnenen Ergebnisse konnten eindeutig nachweisen, daß bei den getesteten biomechanischen Werten zwischen den drei Gruppen, humaner Septumknorpel, 6-Wochen-Gruppe und 12-Wochen-Gruppe kein signifikanter Unterschied bestand. Weder im Elastizitätsmodul ($p= 0,170$) noch bei der Versagensspannung ($p= 0,964$) war eine signifikante Differenz zwischen Tissue engineering Knorpel und nativem Nasenseptumknorpel festzustellen. Diese Aussage traf ebenfalls auf beide TE Knorpel-Gruppen zu, die sich auch untereinander

nicht signifikant unterschieden. Die geringe Streubreite der 12-Wochen-Gruppe in ihren Ergebnissen bestätigte die qualitativ gute Standardisierung der Transplantatherstellung.

Die vorliegende Arbeit führte mit ihren Ergebnissen den Nachweis, daß mit Hilfe von Tissue engineering aus einer kleinen Biopsie um ein Mehrfaches größere, autologe Knorpeltransplantate hergestellt werden konnten, die typische Knorpelcharakteristika aufwiesen und sich biomechanisch nicht signifikant von nativem hyalinen Septumknorpel unterschieden. Mit den gewonnen Erkenntnissen konnte die Aussage getroffen werden, daß der so hergestellte Neoknorpel den klinischen Anforderungen der rekonstruktiven Chirurgie entspricht. Für die Anwendung in der orthopädischen Chirurgie waren die mechanischen Eigenschaften zu gering, so daß noch eine deutliche Verbesserung des Herstellungsprozesses erforscht werden muß.

6 Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei:

Priv. doz. Dr. Michael Sittinger, der als engagierter Projektleiter immer für alle Fragen da war.

Dr. Andreas Haisch für seine Bereitschaft als HNO-Betreuer.

Johanna Golla für die Beschaffung des Labormaterials.

Christopher Gebert für seine Mitarbeit.

Dipl. Ing. Michaela Endres für ihre wertvolle Vor- und Mitarbeit.

Allen Mitgliedern aus dem Labor, die immer hilfsbereit und diskussionsfreudig waren.

Professor V. Jahnke als Klinikdirektor der Hals-Nasen-Ohren Klinik.

Professor Burmester für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes.

Frau Dipl. Math. G. Siebert für ihre freundlichen Unterstützung bei der mathematisch-statistischen Auswertung der Messdaten.

Herrn Klaus Dannenberg für die präzise Herstellung des Teststempels.

Jan Hoffmann für die technische Unterstützung und Einweisung an der Materialprüfmaschine.

Dr. G. Duda für seine Kooperation.

Dem OP-Personal für das zuverlässige Zwischenlagern des Operationsmaterials.

Der DFG (Deutsche Forschungsgesellschaft) für die finanzielle Unterstützung; Projekt Nummer:

Ha 2729/1-3

Bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lausanne, den 16.05.2005

Daniel Schroeder

Rue du Midi 16

CH 1003 Lausanne

Schweiz

Hiermit gebe ich, Daniel Schroeder, die eidstattliche Erklärung ab, meine Dissertation mit dem Titel „*Untersuchung zur Biomechanik und Histomorphologie von Tissue engineering Knorpel aus humanen Nasenseptumchondrozyten.*“ selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst zu haben. Die Literatur und die benutzte Hilfsmittel sind vollständig angegeben. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Daniel Schroeder

8 Anhang mit den vollständigen Ergebnistabellen

In diesen Tabellen werden die rechnerischen Ergebnisse und einige ihrer wichtigsten Zwischenschritte der biomechanischen Messungen zum Elastizitätsmodul und zur Versagensspannung dargestellt. Die Darstellung erfolgt nach der zugehörigen Gruppe.

| Gruppe | Dicke in mm | Delta F/A | Delta L/L | E-Modul in N/mm² | Versagenslast in N | Versagensspannung in N/mm² |
|---------------|------------------------|------------------|------------------|--|-------------------------------|--|
| 6 -Wochen | 1,41 | 2,65 | 0,21 | 12,47 | 79 | 6,29 |
| 6 -Wochen | 1,6 | 1,42 | 0,18 | 7,85 | 43 | 3,42 |
| 6 -Wochen | 1,69 | 2,21 | 0,15 | 14,96 | 90 | 7,17 |
| 6 -Wochen | 1,71 | 1,08 | 0,07 | 15,35 | 73 | 5,81 |
| 6 -Wochen | 1,54 | 0,99 | 0,08 | 11,74 | 117 | 9,32 |
| 6 -Wochen | 1,81 | 1,22 | 0,16 | 7,63 | 44,7 | 3,56 |
| 6 -Wochen | 1,59 | 1,83 | 0,18 | 10,02 | 51,5 | 4,10 |
| 6 -Wochen | 2,07 | 1,16 | 0,14 | 8,03 | 42 | 3,34 |
| 6 -Wochen | 1,81 | 0,53 | 0,04 | 11,98 | 43,5 | 3,46 |
| 6 -Wochen | 1,54 | 2,39 | 0,14 | 16,76 | 77 | 6,13 |
| 6 -Wochen | 1,67 | 1,49 | 0,1 | 15,55 | 63 | 5,02 |
| 6 -Wochen | 1,75 | 1,09 | 0,08 | 13,66 | 53 | 4,22 |
| 6 -Wochen | 1,7 | 1,04 | 0,11 | 9,82 | n. meßbar | n. meßbar |
| 6 -Wochen | 1,4 | 1,40 | 0,11 | 13,02 | 55 | 4,38 |

Tabelle 7: Ergebnisse der 6-Wochen-Gruppe

| Gruppe | Dicke in mm | Delta F/A | Delta L/L | E-Modul in N/mm² | Versagenslast in N | Versagensspannung in N/mm² |
|---------------|------------------------|------------------|------------------|--|-------------------------------|--|
| 12-Wochen | 1,14 | 0,64 | 0,07 | 9,14 | 51 | 4,06 |
| 12-Wochen | 1,38 | 0,61 | 0,09 | 7,04 | 39 | 3,11 |
| 12-Wochen | 1,51 | 3,01 | 0,21 | 14,67 | 67,5 | 5,37 |
| 12-Wochen | 2,21 | 2,91 | 0,21 | 13,97 | 72,5 | 5,77 |
| 12-Wochen | 1,92 | 2,59 | 0,17 | 15,08 | 61 | 4,86 |
| 12-Wochen | 2,0 | 2,41 | 0,16 | 15,09 | 63,5 | 5,06 |
| 12-Wochen | 2,21 | 3,72 | 0,25 | 14,68 | 69,57 | 5,54 |
| 12-Wochen | 2,18 | 2,81 | 0,18 | 15,71 | 56 | 4,46 |
| 12-Wochen | 2,34 | 3,1 | 0,18 | 16,86 | 61 | 4,86 |
| 12-Wochen | 2,25 | 2,98 | 0,17 | 17,17 | 69 | 5,49 |
| 12-Wochen | 1,35 | 2,59 | 0,19 | 13,47 | 78,98 | 6,29 |
| 12-Wochen | 1,55 | 3,18 | 0,22 | 14,49 | 81,02 | 6,45 |
| 12-Wochen | 1,54 | 2,07 | 0,20 | 10,26 | 67,97 | 5,41 |
| 12-Wochen | 1,38 | 3,03 | 0,18 | 16,71 | 68,29 | 5,44 |
| 12-Wochen | 1,15 | 2,91 | 0,2 | 14,53 | 57,66 | 4,59 |
| 12-Wochen | 1,21 | 3,07 | 0,1 | 30,91 | n. meßbar | n. meßbar |

Tabelle 8: Ergebnisse der 12-Wochen-Gruppe

| Gruppe | Dicke in mm | E-Modul in N/mm² | Versagenslast in N | Versagensspannung in N/mm² |
|---------------|------------------------|--|---------------------------|--|
| Nativ | 1,4 | 3,68 | 26,09 | 2,08 |
| Nativ | 2,5 | 10,68 | 51,28 | 4,08 |
| Nativ | 3,8 | 24,82 | 88,66 | 7,06 |
| Nativ | 3 | 19,84 | 76,36 | 6,08 |
| Nativ | 2,5 | 12,78 | 62,17 | 4,95 |
| Nativ | 2,5 | 9,7 | 36,88 | 2,94 |
| Nativ | 1,6 | 10,12 | 31,68 | 2,52 |
| Nativ | 1 | 4,92 | 40,18 | 3,2 |
| Nativ | 2,5 | 6,29 | 29,69 | 2,36 |
| Nativ | 1,58 | 18,01 | 76,76 | 6,11 |
| Nativ | 1,2 | 14,07 | 76,46 | 6,09 |
| Nativ | 4,82 | 16,78 | 62,57 | 4,98 |
| Nativ | 1,43 | 12,66 | 63,17 | 5,03 |
| Nativ | 3,99 | 10,90 | 36,78 | 2,93 |
| Nativ | 3,83 | 13,26 | 40,18 | 3,2 |
| Nativ | 2,56 | 27,28 | 96,45 | 7,68 |
| Nativ | 1,65 | 23,14 | 100,95 | 8,04 |
| Nativ | 1,81 | 18,86 | 99,95 | 7,96 |
| Nativ | 1,72 | 28,03 | 114,95 | 9,15 |
| Nativ | 2,45 | 8,04 | 42,08 | 3,35 |
| Nativ | 1,34 | 17,80 | 107,95 | 8,59 |
| Nativ | 2,2 | 27,33 | 94,85 | 7,55 |
| Nativ | 3,04 | 14,68 | 64,27 | 5,12 |
| Nativ | 2,38 | 26,12 | 90,16 | 7,18 |
| Nativ | 1,68 | 12,14 | 57,77 | 4,6 |

Tabelle 9: Ergebnisse der Nativknorpel-Gruppe

9 Literatur

1 Cook TA, Miller PJ. Auricular reconstruction. *Facial Plast Surg* 1995; 11(4):319-329.

2 Staudenmaier R, Aigner J, Kastenbauer E. Mikrotie: Technik zur Ohrmuschelrekonstruktion mit autologem Rippenknorpel. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2001; 33(3):162-170.

3 Guyuron B, Friedman A. The role of preserved autogenous cartilage graft in septorhinoplasty. *Ann Plast Surg* 1994; 32(3):255-260.

4 Lovice DB, Mingrone MD, Toriumi DM. Grafts and implants in rhinoplasty and nasal reconstruction. *Otolaryngol Clin North Am* 1999; 32(1):113-141.

5 Mathias D. Skin and homograft cartilage reconstruction. *Arch Otolaryngol* 1975; 101(5):301-304.

6 Giguere P. [Homografts of irradiated costal cartilage]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1982; 83(5):284-288.

7 Hellmich S. Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich. *HNO* 1982; 30(4):131-158.

8 Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(1):64-75.

9 Springfield D. Autograft reconstructions. *Orthop Clin North Am* 1996; 27(3):483-492.

10 Shelton WR, Treacy SH, Dukes AD, Bomboy AL. Use of allografts in knee reconstruction: II. Surgical considerations. *J Am Acad Orthop Surg* 1998; 6(3):169-175.

11 Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(14):889-895.

12 Newman AP. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* 1998; 26(2):309-324.

13 Pritzker KP, Gross AE, Langer F, Luk SC, Houpt JB. Articular cartilage transplantation. *Hum Pathol* 1977; 8(6):635-651.

14

Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9(1):37-52.

15

Smith EL. Connective Tissue. *Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry*. New York: McGraw-Hill Book Co. 1983; 211-242

16

Hunter W. On the structure and diseases of articular cartilage. *Philosophical transactions of the English Royal Society* 1743; 514-521.

17

Campbell CJ. The healing of cartilage defects. *Clin Orthop* 1969; 64:45-63.

18

Meachim G, Osborne GV. Repair at the femoral articular surface in osteo-arthritis of the hip. *J Pathol* 1970; 102(1):1-8.

19

Armstrong CG, Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64(1):88-94.

20

Buckwalter JA, Martin JA, Olmstead M, Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Mow VC. Osteochondral repair of primate knee femoral and patellar articular surfaces: implications for preventing post-traumatic osteoarthritis. *Iowa Orthop J* 2003; 23:66-74.

21

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980; 62(1):79-89.

22

Brunner FX. Implantatmaterialien-was hat sich wo und wann bewährt? *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1993; 1:311-336.

23

Rasp G, Staudenmaier R, Ledderose H, Kastenbauer E. Autologe Rippenknorpelentnahme operatives Vorgehen und postoperative Schmerzreduktion. *Laryngorhinootologie* 2000; 79(3):155-159.

24

Kastenbauer ER. Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *HNO* 1983; 31(11):371-380.

25

Rettinger G. Autogene und allogene Knorpeltransplantate in der Kopf-und Halschirurgie (ohne Mittelohr und Trachea). *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1992; 1:127-162.

26

Westhues M. Die antigene Wirkung des Knorpels. 1. Nachweis der antigenen Wirkung des transplantierte Knorpels durch histologische Untersuchungen. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1970; 49(11):750-761.

27

Noverraz PM, Rittersma J. Erfahrungen mit Chondroplast in der ästhetischen Gesichtschirurgie. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 1989; 34:100-103.

28

Hammer C, Bujia J. Immunologie vitaler und konservierter Transplantate. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1992; 1:3-26.

29

Berghaus A. Alloplastische Implantate in der Kopf-und Halschirurgie. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1992; 1:53-95.

30

Schwab W, Mang WL, Meyer R, Walter C, Bienias GB, Grasser H et al. Bioimplantate in der HNO-Chirurgie, Teil 1: Neue Möglichkeiten durch Aluminiumoxid-, Glas-und Trikalziumphosphatkeramik (Hartimplantate). *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1984; 63(7):323-343.

31

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-926.

32

Haisch A, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M. Tissue-engineering humanene Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung biokompatibler resorbierbarer Fibringel-und Polymervliesstrukturen. *HNO* 1996; 44(11):624-629.

33

Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 1994; 21(3):445-462.

34

Benya P, Brown D. Modulation of the chondrocyte phenotype in vitro; Articular cartilage biochemistry. Raven Press New York 1978; 219-233

35

von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267(5611):531-532.

36

Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI. Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 5):1991-1999.

37

Sittinger M, Braunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J. Untersuchungen zum Vermehrungspotential von Nasenseptum-Chondrozyten für die In-vitro Züchtung von Knorpeltransplantaten. *Laryngorhinootologie* 1997; 76(2):96-100.

38

Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000; 21(6):571-580.

39

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30(1):215-224.

40

Bujia J. Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen. *Laryngorhinootologie* 1995; 74(4):205-210.

41

Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas CH, John T, Merker HJ, Scheid A et al. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 2002; 308(3):371-379.

42

Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003; 113(1):25-32.

43

Bujia J, Rotter N, Minuth W, Burmester G, Hammer C, Sittinger M. Züchtung menschlichen Knorpelgewebes in einer dreidimensionalen Perfusionskulturkammer: Charakterisierung der Kollagensynthese. *Laryngorhinootologie* 1995; 74(9):559-563.

44

Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(2):297-302.

45

Guilak F, Butler DL, Goldstein SA. Functional tissue engineering: the role of biomechanics in articular cartilage repair. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S295-S305.

46

Park SS, Ward MJ. Tissue-engineered cartilage for implantation and grafting. *Facial Plast Surg* 1995; 11(4):278-283.

47

Anderer U, Libera J. In vitro engineering of human autogenous cartilage. *J Bone Miner Res* 2002; 17(8):1420-1429.

48

Arevalo-Silva CA, Eavey RD, Cao Y, Vacanti M, Weng Y, Vacanti CA. Internal support of tissue-engineered cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126(12):1448-1452.

49

Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124(6):671-677.

50

Glowacki J. In vitro engineering of cartilage. *J Rehabil Res Dev* 2000; 37(2):171-177.

51

Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop* 1999;(367 Suppl):S176-S185.

52

Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, Sittinger M, Schultz O. Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(3):305-311.

53

Randolph MA, Anseth K, Yaremchuk MJ. Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg* 2003; 30(4):519-537.

54

Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR. Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 1999; 58(3):130-135.

55

Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G et al. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998; 42(3):347-356.

56

Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 1996; 17(3):237-242.

57

Perka C, Schultz O, Sittinger M, Zippel H. Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. Orthopäde 2000; 29(2):112-119.

58

Bujia J, Sittinger M, Minuth WW, Hammer C, Burmester G, Kastenbauer E. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. Acta Otolaryngol 1995; 115(2):307-310.

59

Mow VC, Wang CC. Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage. Clin Orthop 1999;(367 Suppl):S204-S223.

60

Mow VC, Lai WM. Recent developments in synovial joint biomechanics. SIAM J Appl Math 1980; 22:275-371.

61

Ma PX, Schloo B, Mooney D, Langer R. Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage. J Biomed Mater Res 1995; 29(12):1587-1595.

62

Peretti GM, Bonassar LJ, Caruso EM, Randolph MA, Trahan CA, Zaleske DJ. Biomechanical analysis of a chondrocyte-based repair model of articular cartilage. Tissue Eng 1999; 5(4):317-326.

63

Peretti GM, Randolph MA, Zaporozhan V, Bonassar LJ, Xu JW, Fellers JC et al. A biomechanical analysis of an engineered cell-scaffold implant for cartilage repair. Ann Plast Surg 2001; 46(5):533-537.

64

Puelacher WC, Wisser J, Vacanti CA, Ferraro NF, Jaramillo D, Vacanti JP. Temporomandibular joint disc replacement made by tissue-engineered growth of cartilage. J Oral Maxillofac Surg 1994; 52(11):1172-1177.

65

Duda GN, Haisch A, Endres M, Gebert C, Schroeder D, Hoffmann JE et al. Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo. J Biomed Mater Res 2000; 53(6):673-677.

66

Park SS, Chi DH, Lee AS, Taylor SR, Iezzoni JC. Biomechanical properties of tissue engineered cartilage from human and rabbit chondrocytes. Otolaryngol Head Neck Surg 2002; 126(1):52-57.

67

Hough AJ, Sokoloff L. Tissue sampling as a potential source of error in experimental studies of cartilage. *Connect Tissue Res* 1975; 3(1):27-31.

68

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994; 15(6):451-456.

69

Vert M, Li S, Garreau H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. *Clin Mater* 1992; 10(1-2):3-8.

70

Fry DW, Richardson KE. Isolation and characterization of glycolic acid dehydrogenase from human liver. *Biochim Biophys Acta* 1979; 567(2):482-491.

71

Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968; 217(126):370-371.

72

Levkovits, Ivan. The nude mouse in retrospect, proceedings of the second international workshop in nude mice. University of Tokyo Press, Tokyo/ Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1977.

73

Jacobsen GK, Rygaard J, Povlsen CO. Immunological reconstitution of tumour-transplanted and thymus-grafted nude mice. *Exp Cell Biol* 1981; 49(3):148-153.

74

Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments. *J Biomech Eng* 1980; 102(1):73-84.

75

Woo SL, Simon BR, Kuei SC, Akeson WH. Quasi-linear viscoelastic properties of normal articular cartilage. *J Biomech Eng* 1980; 102(2):85-90.

76

Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E et al. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996; 33(2):57-63.

77

Solursh M. Formation of cartilage tissue in vitro. *J Cell Biochem* 1991; 45(3):258-260.

78

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614-636.

79

Gruber R, Sittinger M, Bujia J. Untersuchungen zur in vitro Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung des möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen-Erkrankungen. *Laryngorhinootologie* 1996; 75(2):105-108.

80

Glasgold MJ, Kato YP, Christiansen D, Hauge JA, Glasgold AI, Silver FH. Mechanical properties of septal cartilage homografts. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 99(4):374-379.

81

Kerin AJ, Wisnom MR, Adams MA. The compressive strength of articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng [H]* 1998; 212(4):273-280.

82

Kurz B, Jin M, Patwari P, Cheng DM, Lark MW, Grodzinsky AJ. Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J Orthop Res* 2001; 19(6):1140-1146.

83

Martin I, Obradovic B, Treppo S, Grodzinsky AJ, Langer R, Freed LE et al. Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage. *Biorheology* 2000; 37(1-2):141-147.

84

Park SS, Jin HR, Chi DH, Taylor RS. Characteristics of tissue-engineered cartilage from human auricular chondrocytes. *Biomaterials* 2004; 25(12):2363-2369.

85

Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res* 1994; 12(1):70-78.

86

Waldman SD, Spiteri CG, Grynbas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage. *Tissue Eng* 2004; 10(9-10):1323-1331.

87

Arevalo-Silva CA, Cao Y, Vacanti M, Weng Y, Vacanti CA, Eavey RD. Influence of growth factors on tissue-engineered pediatric elastic cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126(10):1234-1238.

88

Panossian A, Ashiku S, Kirchhoff CH, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue

engineering. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108(2):392-402.

89

Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered human septal cartilage. *Biomaterials* 2002; 23(15):3087-3094.

90

Hartung C, Arnold G, Gross F. The biomechanics of hyaline cartilage under distension stress. *Acta Anat (Basel)* 1975; 91(4):583-593.

91

Arokoski JP, Hyttinen MM, Helminen HJ, Jurvelin JS. Biomechanical and structural characteristics of canine femoral and tibial cartilage. *J Biomed Mater Res* 1999; 48(2):99-107.

92

Williams DF. Mechanisms of biodegradation of implantable polymers. *Clin Mater* 1992; 10(1-2):9-12.

93

Muster D. Biomaterials degeneration; Fundamental aspects and related clinical phenomena. Barbasa MA, editor. Elsevier Science Publishers B.V. 1991.

94

Bujia J, Alsalameh S, Naumann A, Wilmes E, Sittinger M, Burmester GR. Humoral immune response against minor collagens type IX and XI in patients with cartilage graft resorption after reconstructive surgery. *Ann Rheum Dis* 1994; 53(4):229-234.

95

Schultz O, Keyszer G, Zacher J, Sittinger M, Burmester GR. Development of in vitro model systems for destructive joint diseases: novel strategies for establishing inflammatory pannus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(8):1420-1428.

96

Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop* 2000;(379 Suppl):S171-S178.

97

Begemann JF, Pollok JM, Kaufmann PM, Kluth D, Broelsch CE, Rogiers X. In vitro demonstration of survival and secretory function of islets of Langerhans encapsulated with a membrane of tissue-engineered chondrocytes for immunoisolation. *Transplant Proc* 1999; 31(8):3250-3252.

98

Lee IW, Vacanti JP, Taylor GA, Madsen JR. The living shunt: a tissue engineering approach in the treatment of hydrocephalus. *Neurol Res* 2000; 22(1):105-110.

99

Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(10):1248-1252.

100

Megerian CA, Weitzner BD, Dore B, Bonassar LJ. Minimally invasive technique of auricular cartilage harvest for tissue engineering. *Tissue Eng* 2000; 6(1):69-74.

101

Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Injectable tissue engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103(7):1809-1818.

102

Xu JW, Zaporozhan V, Peretti GM, Roses RE, Morse KB, Roy AK et al. Injectable tissue engineered cartilage with different chondrocyte sources. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113(5):1361-1371

103

Passaretti D, Silverman RP, Huang W, Kirchoff CH, Ashiku S, Randolph MA et al. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. *Tissue Eng* 2001; 7(6):805-815.

104

Saim AB, Cao Y, Weng Y, Chang CN, Vacanti MA, Vacanti CA et al. Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold. *Laryngoscope* 2000; 110(10 Pt 1):1694-1697.