

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde / Kopf-Hals-Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM) im Tissue
Engineering von humanem Knorpelgewebe

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Liese

aus Potsdam

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Haisch
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Sittinger
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Naumann

Datum der Promotion: 20.11.2009

*Diese Arbeit widme ich voll Dankbarkeit
meinem ganz besonderem Freund, der mir
stets Mentor, Kritiker, Ratgeber und Retter
in der Not war, Dr. med. Michael Krueger.*

Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM) im Tissue Engineering von humanem Knorpelgewebe

*„From Hippocrates to the present age it is universally allowed that ulcerated
cartilage is a troublesome thing and that, once destroyed, is not repaired.“*
Sir William Hunter (1743)

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	2
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	5
<u>1. Einleitung</u>	6
1.1. Tissue Engineering	6
1.2. Tissue Engineering in der HNO und Plastisch-Rekonstruktiven-Chirurgie	9
1.2.1. Aufbau und Funktion des Knorpelgewebes	9
1.2.1.1. Hyaliner Knorpel	11
1.2.1.2. Elastischer Knorpel	11
1.2.1.3. Faserknorpel	12
1.2.2. Stand der Forschung und verwendete Biomaterialien	13
1.3. Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM)	17
1.4. Herleitung der Aufgabenstellung	20
<u>2. Methodik und Materialien</u>	24
2.1. Materialien und allgemeine Durchführung	25
2.1.1. Humane Spender-Chondrozyten aus dem Nasenseptum	25
2.1.2. Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM)	25
2.1.3. Präparation und Verdau von Nasenseptumknorpel	26
2.1.4. Einfrierprozedur für Knorpelzellen	26
2.1.5. Zellkulturmedium (CGM)	27
2.1.6. Amplifizierung einer Monolayerkultur (Trypsinieren und Passagieren)	27
2.1.7. Zellzählung mit der „Neubauer Zählkammer“	28
2.1.8. Zellkultivierung	28
2.2. Teil I: Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten	29
2.2.1. Auswertung	30
2.2.1.2. Histologie	30
A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	31
B) Alcianblau-Färbung	31
2.2.1.2. Immunhistochemie	32
2.2.1.3. Western-Blot-Analysen	33
A) Vorbereitung der Proben	33
B) Proteinbestimmung und –konzentrierung	34
C) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	34
D) Blockierung und Antikörper-Bestückung	35
E) Detektion der Proteinbanden und Auswertung	35

2.3. Teil II: In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM	36
2.3.1. Herstellung eines Makroaggregates	36
2.3.2. Aufbau und Durchführung des Versuches	36
2.3.3. Auswertung	39
2.3.3.1. Bestimmung des Peressigsäure (PES)-Gehaltes	39
2.3.3.2. Gaschromatographie	40
2.3.3.3. Entnahme der Proben	40
2.3.3.4. Histologie	40
2.3.3.5. Immunhistochemie	40
2.4. Teil III: Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchung	42
2.4.1. Aufbau und Durchführung des Versuches	42
2.4.2. Zellproliferationstest: WST-1-Test	44
2.4.3. Zellproliferationstest: BrdU-Test	45
2.4.4. Vitalfärbungen: Lebend-Tot-Darstellung	47
<u>3. Ergebnisse</u>	48
3.1. Allgemeines	48
3.1.1. Chondrozytenisolierung und -vermehrung	49
3.1.2. Veränderung der Zellmorphologie in der Monolayerkultur	50
3.2. Teil I: Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten	52
3.2.1. Histologie	52
3.2.2. Immunhistochemie	53
3.2.3. Western-Blot-Analysen	53
3.3. Teil II: In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM	54
3.3.1. Untersuchung des Peressigsäuregehaltes im Zellkulturmedium	54
3.3.2. Gaschromatographische Analyse des Zellkulturmediums auf Chloroform	54
3.3.3. Histologische Auswertung	55
3.2.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	55
3.2.3.2. Alcianblau-Färbung	58
3.3.4. Immunhistochemie	61
3.3.4.1. Kollagen II	61
3.3.4.2. Kollagen I	64
3.3.4.3. Caspase III	66
3.4. Teil III: Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchung	69
3.4.1. Zellproliferationstests: WST-1- und BrdU-Test	69
A) Chondrozyten + DBM	69
B) Chondrozyten + Zellkulturmedium von Ansatz 3 (DBM ohne Zellen)	71
C) Chondrozyten + Zellkulturmedium von Ansatz 4 (DBM mit Zellen)	73
3.4.2. Vitalfärbungen: Lebend-Tot-Darstellung	76

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	80
<u>4. Diskussion</u>	82
4.1. Bewertung der Ergebnisse	83
4.1.1. Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten	83
4.1.2. In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM	84
4.1.2.1. Analyse des Zellkulturmediums (CGM) auf Chloroform und Peressigsäure	85
4.1.2.2. Die Kultivierung der Chondrozyten-Makroaggregate in der DBM bzw. mit dem Zellkulturmedium der DBM	87
4.1.3. Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen	92
4.2. Ausblick und Beurteilung der Eignung der DBM im Tissue Engineering von humanen Knorpelgeweben	97
<u>5. Zusammenfassung</u>	101
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	105
<u>7. Danksagung</u>	112
<u>8. Eidesstattliche Erklärung</u>	113
<u>9. Lebenslauf</u>	114
<u>10. Publikation</u>	115

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
BrdU	5-Brom-2-desoxy-Uridin
CGM	Cell growth medium = Zellkulturmedium
CO ₂	Kohlendioxid
DBM	demineralized bone matrix = demineralisierte Knochenmatrix
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleid Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay = Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal-calf-serum
FDA	Fluorescindiacetat
FGF-β	Fibroblast-growth-factor-β
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
IGF	Insulin-like growth factor
IH	Immunhistochemie
MA	Makroaggregat
MELS	Modular Extracorporeal Liver Support
PBS	Phosphate-buffered saline solution
PES	Peressigsäure
PI	Propidiumjodid
Ppm	Parts per million; 1 ppm = 10 ⁻⁶ = Teile pro Million = 0,0001 %
PVDF-Membran	<u>P</u> oly <u>v</u> inylid <u>e</u> n <u>f</u> luorid-Membran
Rpm	rounds per minute
SDS-Page	Engl.: <u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl <u>s</u> ulfate- <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide- <u>G</u> el- <u>E</u> lectro- phoresis
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming-Growth-Factor-β

1. Einleitung

1.1. Tissue Engineering

Der Begriff des Tissue Engineering soll erstmalig im Jahre 1987 von Professor Y.C. Fung (University of California, San Diego) auf einem Treffen der National Science Foundation geprägt worden sein. Ein Jahr später fand in Kalifornien der erste „Tissue Engineering“-Kongress statt [1].

Dieses Forschungsgebiet bezeichnet einen multidisziplinären Bereich, der sich u.a. aus den Fachgebieten der Biologie, Medizin und Technik zusammensetzt und zum Ziel hat, die Gesundheit und die Lebensqualität für Millionen von Menschen weltweit durch die Wiederherstellung, Erhaltung oder auch Optimierung von Gewebe- und Organfunktionen zu verbessern [2, 3].

In der Regel werden hierfür zunächst kleine Proben des entsprechenden Gewebes vom Patienten entnommen. Die Zellen werden dann in vitro kultiviert und nach Erreichen einer entsprechenden Zellzahl mit einem geeigneten Biomaterial zu einem vorläufigen Ersatzgewebe angeordnet. Diese Biomaterialien sind strukturelle synthetische oder nicht-lebende natürliche Gerüste, die entwickelt werden, um die Zellorganisation, Zelldifferenzierung und auch das Zellwachstum für die Entwicklung von funktionierenden Geweben auszurichten, d.h. sie übernehmen so für eine bestimmte Zeit die Aufgaben des extrazellulären Gewebeanteils. Aus diesem Grund werden vorwiegend solche Materialien verwendet, die parallel zur Neubildung der eigenen Zellmatrix abgebaut werden. Durch die Zugabe von angiogenen Faktoren, Wachstumsfaktoren und auch speziellen Zellkulturmedien kann das Zellwachstum und auch die Differenzierung beschleunigt werden [4, 5]. Anschließend ist es möglich, das Ersatzgewebe zu implantieren.

Die Bedeutung des Tissue Engineering, resultierend vor allem aus dem anhaltend großen Bedarf an sogenannten Ersatzgeweben/-organen, war und ist nach wie vor sehr groß. Mit der ersten Herztransplantation durch C. Barnard im Jahre 1967 und die erste Lebertransplantation durch B. Eisemann im gleichen Jahr wurde die Ära der Organtransplantationen eingeläutet. Je nach Übereinstimmung des Spendergewebes/-organs und des Empfängers kann man verschiedene Formen der Transplantation unterscheiden: autogene, allogene und xenogene Transplantation (siehe Tabelle 1) [1].

Art der Transplantation	Erläuterung
Autogen	Empfänger und Spender der Zellen/Gewebe sind identisch Vorteil: keine Immunabwehr
Allogen	Zellen/Gewebe von einem genetisch nicht-identischen Menschen Nachteil: meist Immunsuppression erforderlich, Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten
Xenogen	Übertragung von Zellen/Gewebe von einem Tier, z.B. Schwein Nachteil: Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten, begrenzte Haltbarkeit

Tab. 1: Beschreibung der Transplantationsmöglichkeiten

In den letzten Jahrzehnten haben Organtransplantationen und die Weiterentwicklungen von immunsuppressiven Therapien nicht nur das Leben von Patienten mit finalem Organversagen verlängert, sondern auch die Lebensqualität erheblich verbessert. Dennoch stellen der Mangel an ausreichenden Spenderorganen, Abstoßungsreaktionen und die schweren Nebenwirkungen der lebenslangen Einnahme von Immunsuppressiva und dadurch die Gefahr von therapieresistenten Infektionen, sowie die Entwicklung von Malignomen, erhebliche Schwierigkeiten dar [6]. Laut der Deutschen Gesellschaft für Organtransplantation warten allein in der BRD über 12.000 Menschen auf ein Spenderorgan, davon alleine über 8.000 auf eine Spenderniere. Besonders bedrückend ist die Situation bei Leber- und Herztransplantationen: so müssen einige Patienten wegen schlechten Allgemeinzustandes von der Warteliste genommen werden und andere sterben, weil kein Spenderorgan rechtzeitig zur Verfügung steht [3]. Im Jahre 1993 gab es in Europa gerade einmal 14,7 Spender pro 1 Million Einwohner [7]. Nach anderen Untersuchungen tritt bei 4.000 bis 5.000 der 500.000 Todesfälle in deutschen Krankenhäusern pro Jahr der Hirntod ein, bei denen theoretisch eine Organspende denkbar (über 50 pro eine Millionen Einwohner) gewesen wäre [8].

Alternativen zu menschlichen Transplantaten gibt es in Form von tierischen Zellen, Geweben und Organen. Zu erwähnen sind neben porcinen Herzklappen und porcinen Pankreaszellen auch porcine Leberzellen auf dem Gebiet der Leberersatzverfahren. Bioartifizielle Lebersysteme wie z.B. HepatAssist, aber auch das MELS-Verfahren arbeiten mit Schweineleberzellen [1]. Dennoch können Xenografts das menschliche Gewebe nicht ausreichend ersetzen. Begrenzte Haltbarkeit bei porcinen Herzklappen [9, 10], Abstoßungsreaktionen [11] und die Gefahr von Infektionen z.B. mit dem

endogenen Retrovirus des Schweins (PERV = porcine endogenous retrovirus) sind nur einige der auftretenden Probleme [12].

Patienteneigenes Gewebe, d.h. autogenes Gewebe ist aus immunologischer Sicht ideal für den Gewebe- und Organersatz, denn Abstoßungsreaktionen und damit immunsuppressive Therapien spielen hier keine Rolle. Aus diesem Grunde ist der Kultivierung von humanen Zellen außerhalb des menschlichen Körpers in der Forschung in den letzten Jahrzehnten eine große Bedeutung beigemessen worden. 1975 gelang es den beiden Forschern Rheinwald und Green erstmals Hautzellen zu kultivieren [13]. Durch diese Errungenschaft war es in den 80iger Jahren erstmals möglich, in-vitro kultivierte Haut bei Verbrennungspatienten zu transplantieren [14, 15]. Bis zum Jahr 2007 sind über 200.000 Patienten mit „tissue-engineered“ Haut therapiert worden [1].

Aufgrund dieser herausgehobenen Bedeutung entwickelte sich das Gebiet des Tissue Engineering Mitte der 80iger Jahre zu einem eigenständigen Forschungsgebiet. In den letzten Jahrzehnten gelang es, viele unterschiedliche Konzepte und ein großes Spektrum an Biomaterialien zu entwickeln, die als Gerüst bzw. Trägermaterial für die verschiedensten in-vitro kultivierten Zellen dienen.

1.2. Tissue Engineering von Knorpelgewebe in der HNO und Plastisch-Rekonstruktiven Chirurgie

Der Forschungsbereich des Tissue Engineering ist nicht nur bedeutsam für den Ersatz von ganzen Organen, wie Herz, Leber, Lunge etc., sondern auch für die rekonstruktive Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich zur Wiederherstellung der Funktion und Form von knorpeligen Strukturen wie Ohr, Nase, Kehlkopf und Trachea.

1.2.1. Aufbau und Funktion des Knorpelgewebes

Knorpelgewebe gehört zur Gruppe der Bindegewebe mit einer Stützfunktion. Aufgebaut ist das Gewebe aus den Knorpelzellen, den sogenannten Chondrozyten, und der Interzellulärsubstanz, die auch als Matrix bezeichnet wird. Knorpel spielt auch eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Skelettsystems, denn in der Embryonalentwicklung werden die meisten Skelettanteile zunächst knorpelig angelegt.

Die Verwandtschaft der Chondrozyten mit den Fibroblasten erklärt, dass Chondrozyten, welche in Monolayerkulturen angezogen werden, dedifferenzieren können und somit fibroblastenartige Zellen entstehen [16].

Die Knorpelzellen produzieren die weiträumige Matrix, die hauptsächlich aus kollagenen und elastischen Fasern und einer Grundsubstanz aus sulfatierten Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen besteht. Diese Matrix bestimmt die Eigenschaften des Knorpels. Er ist fest, elastisch, in gewissen Grenzen verformbar und kann daher Druck- und Zugbelastungen kompensieren. Er wirkt somit insgesamt stoßdämpfend. Am häufigsten kommt Kollagen II in der Matrix vor. Neben Kollagen IX, das die Kollagen II-Fibrillen miteinander verbindet, findet man auch Kollagen X (umgibt hypertrophierte Chondrozyten) und Kollagen XI [17].

Die Knorpelzellen liegen in kleineren Gruppen dicht beieinander, die durch eine oder zwei mitotische Teilungen aus einer Mutterzelle entstanden sind (isogene Zellgruppe). Die Matrix in der unmittelbaren Umgebung der Knorpelzellen wird Knorpelhof genannt. Eine Knorpelzellgruppe und ein Hof bilden zusammen ein Knorpelterritorium, die sogenannten Chondrone. Die Interzellulärsubstanz zwischen den Chondronen wird als Interterritorium bezeichnet und enthält keine Zellen.

Der ausgereifte Knorpel besitzt weder Blut-, noch Lymphgefäße oder Nerven [17]. Die Ernährung erfolgt über Diffusion durch die wasserreiche Matrix hindurch. Der Stoffwechsel ist zu einem erheblichen Teil anaerob.

Der Knorpel wird von einem speziellen Bindegewebe umgeben, dem sogenannten Perichondrium. Von innen nach außen lassen sich zwei Schichten unterscheiden:

- Stratum cellulare – zellreich
- Stratum fibrosum – zellarm

Vom Perichondrium kann in einem begrenzten Umfang Knorpelregeneration ausgehen [18, 19].

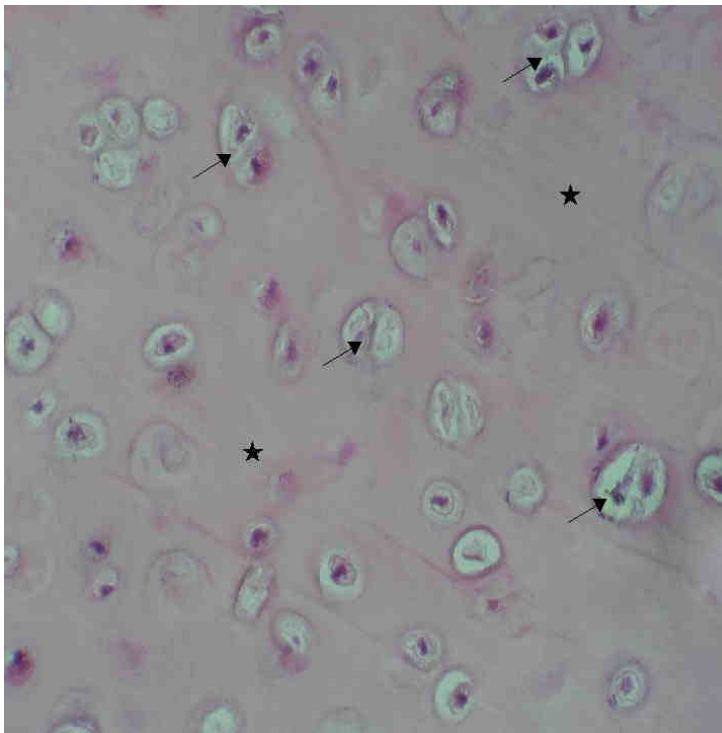
Je nach morphologischen Charakteristika der Interzellulärsubstanz unterscheidet man zwischen hyalinem, elastischem und Faserknorpel. Das Vorkommen der verschiedenen Knorpeltypen im menschlichen Körper zeigt Tabelle 2.

Knorpeltyp	Vorkommen
Hyaliner Knorpel	<ul style="list-style-type: none"> • embryonales Skelett (Primordialskelett) • Trachea, große Bronchien • Teile des Nasenskeletts • Gelenkflächen • Ansatz der Rippen
Elastischer Knorpel	<ul style="list-style-type: none"> • Ohrmuschel • Tuba auditiva • Epiglottis • Teile des Kehlkopfes • Kleine Bronchien
Faserknorpel	<ul style="list-style-type: none"> • Zwischenwirbelscheiben • Menisci des Knies • Kiefergelenk • sternoklavikuläres Gelenk • Symphysis pubis • Bereich der Sehnenansätze am Knochen

Tab. 2: Vorkommen der verschiedenen Knorpeltypen im menschlichen Körper

1.2.1.1. Hyaliner Knorpel

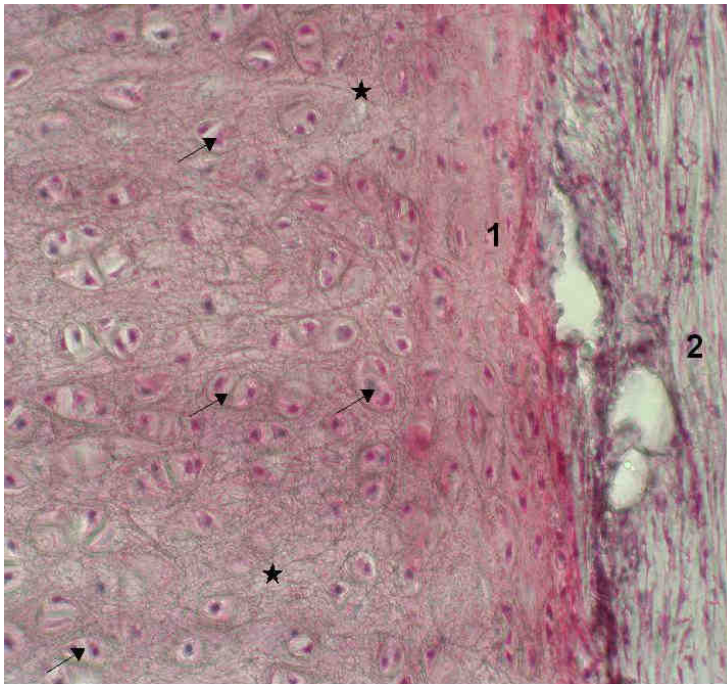
Dies ist der häufigste Knorpeltyp beim Erwachsenen. Den Namen verdankt dieser Knorpeltyp seinem Aussehen, denn das griechische Wort „hyalos“ bedeutet soviel wie Glas. Hyaliner Knorpel erscheint makroskopisch glasig und hat eine weißlich-bläuliche Färbung. Die Knorpelterritorien bestehen je nach Anschnitt aus zwei bis sechs Knorpelzellen. Die Kollagenfibrillen sind „maskiert“ und somit erscheint die Interzellulärsubstanz im Lichtmikroskop homogen [17, 20].



**Abb. 1: Hyaliner Knorpel aus dem Nasenseptum eines 31-jährigen Patienten (siehe Tab.10, Nr. 22): Chondrone (→) umgeben von interterritorialer Matrix (★)
Vergrößerung 20fach
HE-Färbung**

1.2.1.2. Elastischer Knorpel

Der elastische Knorpel besitzt zusätzlich elastische Fasernetze, die die Chondrone umspinnen und die durch die interterritoriale Matrix verlaufen. Des Weiteren haben die elastischen Fasern Verbindung zum Perichondrium. Die Chondrone sind oft kleiner als im hyalinen Knorpel und die Knorpelzellen sind oft in Reihe angeordnet. Zu finden ist elastischer Knorpel an Stellen, an denen außer Druckkompensation auch Biegsamkeit (Elastizität) erforderlich ist. Makroskopisch erscheint der Knorpel leicht gelblich [20].



**Abb. 2: Elastischer Knorpel aus dem Schweineohr: Chondrone (→) umgeben von interterritorialer Matrix (★) mit einem ausgeprägten Fasernetz; Randzone des Knorpels (1), Perichondrium (2)
Färbung: IH, Kollagen II
Vergrößerung 20fach**

1.2.1.3. Faserknorpel

Faserknorpel ähnelt dem Aussehen von straffem Bindegewebe, denn es ist reich an nicht-maskierten Bündeln von Kollagenfasern des Typs I. Zwischen diesen Fasern findet man kleine Chondrone, aber auch einzelne Chondrozyten. Sie sind von einer Knorpelmatrix aus Kollagen Typ II umgeben. Der Faserknorpel besitzt kein Perichondrium. Dieser Knorpeltyp kann aus straffem Bindegewebe hervorgehen, wenn auf den Knorpel nicht nur Druck-, sondern auch Zugkräfte wirken [20].

1.2.2. Stand der Forschung und verwendete Biomaterialien

Traumatische, tumoröse, aber auch kongenitale Läsionen im Bereich des Kopfes erfordern eine Rekonstruktion nicht nur aus funktionellen, sondern auch aus ästhetischen Gesichtspunkten. Die Rekonstruktion von kleineren Knorpeldefekten ist durch die Verwendung von autologem Knorpel möglich. Die Verwendung von Rippen- und Ohrknorpel ist ein häufig verwendetes Verfahren [21]. Die Ohrmuschelrekonstruktion mit autologem Rippenknorpel hat sich in den letzten Jahrzehnten etabliert [22, 23]. Doch die Komorbidität durch die Entnahme von autologem Rippenknorpel, intraoperative Komplikationen, wie z.B. Pleuraverletzungen oder ästhetische Beeinträchtigungen durch die Narbe am Thorax sind nur einige der auftretenden Probleme bei diesem Verfahren [23-25]. Ebenso kann die Kalzifizierung von Rippenknorpel einen negativen Einfluss auf die mechanische Qualität des verwendeten Autografts haben [21].

Bei der Rekonstruktion größerer Defekte stößt man schnell an die Grenzen der Verfügbarkeit. Die erschwerte Formung, die geringere Stabilität und die Morbidität des Spenders stellen weitere Probleme dar [26]. Eine Alternative ist hier das Forschungsgebiet des Tissue Engineering: anstatt ein ganzes Gewebe zu transplantieren, können einzelne körpereigene Zellen entnommen, auf Biomaterialien kultiviert und anschließend transplantiert werden [26, 27]. Die Vermehrung der Chondrozyten erfolgt zunächst in Monolayerkulturen. In diesen Kulturen neigen Chondrozyten jedoch zur Dedifferenzierung, d.h. die Zellen verlieren ihren chondrozytotypischen Phänotyp [28] und gehen in einen fibroblastenähnlichen Zustand mit spindelförmigen Formen über. Des Weiteren kommt es zu einer Umschaltung der Kollagensynthese von Kollagen Typ II zu Kollagen Typ I und III. Zu Beginn der achtziger Jahre konnte gezeigt werden, dass die dedifferenzierten Chondrozyten nach Suspension in Agarosegel in der Lage sind, zu redifferenzieren und wieder ihre knorpeltypische Matrix zu exprimieren [16, 29].

Für die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung benötigen die Chondrozyten eine extrazelluläre Matrix, an die sie sich binden können [30]. Am vielversprechendsten sind resorbierbare Biomaterialien, denn nicht-resorbierbare Biomaterialien können zu chronischen Infektionen und zu Fremdkörperreaktionen führen [30]. Zu den häufig verwendeten Trägermaterialien gehören u.a. Agarose, Alginat, Fibrin, Hyaluronsäure, Kollagen- und Polymerstrukturen z.B. aus Polylaktid,

welche zum größten Teil sowohl in-vitro als auch in-vivo getestet wurden [31]. Viele der bisher getesteten Materialien haben günstige Eigenschaften, unterliegen aber auch Einschränkungen. Agarose beispielsweise ermöglicht eine homogene Zellverteilung, und die Syntheseleistung der Zellen und die Ausbildung einer extrazellulären Matrix konnte mit nativem Knorpelgewebe verglichen werden [32]. Die mangelnde Biokompatibilität und die schlechte biologische Abbaubarkeit machen allerdings eine klinische Anwendung problematisch [33].

Eine interessante Alternative stellen synthetische, resorbierbare Vliesstrukturen z.B. aus Polyglykolid und Polylaktid dar. Ihre gute Biokompatibilität, die Gewährleistung optimaler Ernährungsbedingungen und ihre dreidimensionale Struktur ermöglichen eine gute Kultivierung der Chondrozyten [34, 35]. Als nachteilig erwies sich jedoch eine inhomogene, dreidimensionale Zellverteilung mit geringer Zellanhaftung und dadurch die Ausbildung einer minderwertigen Knorpelmatrix [21]. Der Einschluss von Polylaktid-Säure in Chitosan, einem natürlich vorkommenden Polysaccharid, konnte die Chondrozytenadhäsion, Zellfunktion und Zellproliferation verbessern [36]. Ein weiteres Problem in-vivo stellt das Freiwerden von Säuren bei der Degradation und Resorption von Polymeren dar. Resultierend treten unspezifische inflammatorische Reaktionen auf [37]. Zahlreiche Studien zur klinischen Anwendung von Polymeren finden sich vor allem auf dem Gebiet des Tissue Engineerings bei Gelenkknorpelersatz [38, 39].

Mit Alginat, ein aus Algen isoliertes Polysaccharid, konnten erfolgreich Chondrozyten kultiviert werden. Mit Chelatbildnern wie Citrat kann Alginat auch wieder leicht entfernt werden. Doch auch hier sind die eingeschränkte Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität von Nachteil [33].

Natürliche Polymere, wie z.B. Hyaluronsäure, zeigten vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit Gelenkknorpeldefekten im Knie [40]. Hyaluronsäure ist ein natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix und ist somit biokompatibel und bioresorbierbar und kann durch ihre hohe Wasserspeicherkapazität einen dem Knorpel ähnlichen Gewebeturgor simulieren. Durch ihre geringe Viskosität kann jedoch aus Hyaluronsäure allein kein formstabiles Chondrozytentransplantat hergestellt werden, so dass eine erhöhte Rigidität des Knorpeltransplantates erst durch die Kombination von Hyaluronsäure mit z.B. Alginat erreicht werden kann [41]. Injizierbare Gele, wie Fibrinkleber, sind ebenfalls geeignet, sowohl in der Kopf-Hals-Chirurgie, als auch beim Gelenkknorpelersatz [30]. In Chondrozytenkulturen

unterstützt Fibrin die spezifische Matrixproduktion und Chondrozytenproliferation. Die Dedifferenzierung der Knorpelzellen in Fibrin, die dadurch verlängerte Zellkulturdauer und die eingeschränkte mechanische Stabilität sind allerdings Probleme der weiteren Anwendung [42].

Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen zur in-vitro-Kultivierung von Knorpelzellen. Klinische Erfolge, wie in der Therapie von Gelenkknorpeldefekten mit kultivierten Knorpelzellsuspensionen [43], konnten in der Plastisch-Rekonstruktiven Chirurgie noch nicht erreicht werden. Der Schwerpunkt liegt hier in der Herstellung geformter dreidimensionaler Transplantate [26, 44, 45]. Fremdkörperreaktionen gegenüber den verschiedenen Biomaterialien, unspezifische Entzündungsreaktionen, fibröse Gewebeveränderungen und Transplantatschrumpfungen sind nur einige der zu bewältigenden Probleme im Tissue Engineering von Knorpelgewebe. Das Einwachsen von Fibroblasten führt zu minderwertigem hyalinen Knorpel [46]. Bisher kann keine der verwendeten Biomaterialien alle Bedingungen für eine optimale Kultur in vitro und Transplantatgenerierung erfüllen, so dass die Kombination verschiedener Biomaterialien sinnvoll erscheint [33]. Die Kombination z.B. von dem sehr gut biokompatiblen und seit zwei Jahrzehnten verwendeten und untersuchten Fibrin mit Polymervliesen als formbares, dreidimensionales Gerüst ist ein hoffnungsvoller Ansatz [26, 44]. Mit der Herstellung von autologem Fibrin können immunologische und allergische Reaktionen vermieden werden [47].

Eine weitere erfolgversprechende Möglichkeit ist die Membranverkapselung von Knorpeltransplantaten mit einer Polyelektrolytkomplexmembran aus Natriumcellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid, denn die Kapsel schützt das Transplantat vor zu früher Resorption bei gleichzeitiger Gewährleistung einer ausreichenden Ernährung [48]. Trotz des Schutzes des Knorpeltransplantates vor immunologischen Reaktionen und Infiltration von Fibroblasten, kam es ortständig zu einer leichten Immunreaktion und vermehrtem Wachstum von Fibroblasten [48, 49].

Durch die Kombination verschiedener Trägermaterialien ist es bereits gelungen, Knorpel herzustellen, dessen biomechanische Eigenschaften denen des natürlichen Nasenseptumknorpels entsprechen, während dagegen die biomechanische Qualität der des nativen Gelenkknorpels deutlich unterlegen war [50, 51].

Das Bild einer Maus mit einem menschlichen Ohr auf dem Rücken schürte vor einigen Jahren sowohl bei Forschern, als auch in der Bevölkerung die Hoffnung, innerhalb kürzester Zeit komplette Ohren und bald auch ganze Gewebe züchten zu

können [52]. Doch bis heute ist der Einsatz von „tissue-engineered“ Knorpel in der Klinik auf einzelne Fallberichte begrenzt [30].

Neue Biomaterialien, die Verwendung von Wachstumsfaktoren, veränderte Kulturbedingungen, neue molekulargenetische Erkenntnisse, Fortschritte auf dem Gebiet der Immunologie, aber auch im Bereich der Stammzellforschung werden die Fortschritte der letzten Jahre und Jahrzehnte auf dem Gebiet des Knorpelersatzes weiter ausbauen und den Weg für einen optimalen Ersatzknorpel bereiten.

Die vorliegende Arbeit versucht einen Beitrag dazu zu leisten und beschäftigt sich deshalb mit demineralisierter Knochenmatrix, einem natürlichen und viel versprechendem Biomaterial.

1.3. Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM)

Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM = demineralized bone matrix) wird, seit den Grundlagenforschungen von Urist in den 50- und 60iger Jahren [53], weltweit in verschiedenen Darreichungsformen, vor allem in der Orthopädie und Chirurgie, zur Auffüllung von Knochendefekten verwendet [54, 55]. Die klinische Anwendung von DBM bei Hunden mit Tibiafrakturen, Tibia-Osteotomien und Arthrodesen zeigte, dass die Anwendung dieses Biomaterials als unbedenklich zu beurteilen ist und die Heilungsphase deutlich verkürzt werden konnte. Die Rate der postoperativen Komplikationen wurde durch den Einsatz von demineralisierter Knochenmatrix nicht erhöht [56]. Der Einsatz von DBM in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde wurde u.a. bei problematischen Mastoidhöhlen nach mehreren Cholesteatom-Operationen beschrieben [57]. Auch für die Behandlung von zystischen Unterkieferläsionen wurde DBM verwendet. Durch diesen Einsatz konnten Kieferzysten schneller heilen und eine vollständigere Knochenregeneration nachgewiesen werden [58]. Allein in Deutschland wurden im Jahr 1990 25.000 allogene Knochengewebe transplantiert [59]. Autografts können in Form von aspiriertem Knochenmark oder weiterverarbeiteten Zellen aus der Spongiosa oder der Kompakta des Knochens gewonnen werden. Von Vorteil sind auch hier die fehlende Immunreaktion und die hohe osteogene und osteoinduktive Aktivität der entnommenen Zellen. Die überwiegende Zahl des transplantierten Knochengewebes ist autogen [59]. Doch die begrenzte Verfügbarkeit macht die Gewinnung von allogenen Knochentransplantaten notwendig.

Humaner demineralisierter Knochen wird nach dem Tod von Organspendern entnommen. Nach Prüfung einer eventuellen Infektion des Spenders zum Todeszeitpunkt wird der Knochen entnommen und einer Sterilisation unterzogen. Urist etablierte mit seinen Kollegen eine Methode, um einen chemisch sterilisierten, autolysierten und antigenfreien Knochen herzustellen [60]. Mittlerweile sind verschiedene Verfahren bekannt. Dazu gehört u.a. die Bestrahlung mit Gamma-Strahlen [61], die thermische Sterilisation [62] und die Behandlung mit Peressigsäure und Ethanol [63, 64]. Zurzeit sind unterschiedliche Darreichungsformen auf dem Markt: Puder, Körner, Gel, Würfel, Streifen oder Blöcke. Auch patientenspezifische Formen und Größen der DBM sind produzierbar.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die DBM osteoinduktive Aktivität nach der Transplantation entfaltet [53]. So konnte nachgewiesen werden, dass neben Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) und Bone-Morphogenetic-Protein (BMP) auch Insulin-like growth factor (IGF) in der DBM vorkommt [65] und diese Faktoren nicht nur die Osteogenese, sondern auch die Chondrogenese induzieren können [66-69].

Ein weiterer Vorteil ist die einfache Handhabung der DBM. Nach Rehydrierung der zu transplantierenden Knochenmatrix in physiologischer Kochsalzlösung wird diese weich und kann beliebig geformt und ohne spezielle Instrumente nach Belieben geschnitten werden. Auch eine Zugabe von anderen Substanzen vor der Transplantation sowie Einwirkzeiten entfallen [57]. Des Weiteren wird die DBM in Abhängigkeit von der lokalen Durchblutung und des Transplantationsortes nach einigen Wochen mit Hilfe von Makrophagen resorbiert [70, 71].

In mehreren in-vivo Versuchen in Kaninchen konnte eine Kultivierung von Chondrozyten in demineralisierter Knochenmatrix erfolgreich nachgewiesen werden [72, 73]. In diesen Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass Perichondrium, das die DBM umgibt, die Vitalität und die Quantität der produzierten Knorpelmatrix, im Gegensatz zu Konstrukten aus DBM und Chondrozyten ohne Perichondrium, erhöht [70]. Auch der Abbau der DBM war deutlich langsamer, wenn dieses von einem Perichondriumlappen umgeben war. Die Implantation des demineralisierten Knochens in die Ohrmuschel und die gleichzeitige Deckung mit einem gestielten Perichondriumlappen ist nach bisherigen tierexperimentellen Studien die beste Methode zur in-vivo-Züchtung von Knorpel [74].

Im Jahre 1994 wurde eine Arbeit veröffentlicht, die die Anwendung von DBM am Menschen beschreibt. Ein 6-jähriges Kind hatte nach einer Verletzung des Nasenseptums rezidivierendes, fast tägliches Nasenbluten, Krustenbildung und eine permanente Mundatmung. Der demineralisierte Knochen wurde aus einem Rind (Osteovit) gewonnen und nach beschriebener Aufarbeitung in die Ohrmuschel des Kindes implantiert und mit Ohrperichondrium bedeckt. Nach 6 Wochen wurden in einer 2. Operation das Transplantat aus dem Ohr entfernt und mit diesem der Nasenseptumdefekt verschlossen. Diverse Biopsien zeigten, dass die bovine Knochenmatrix fast vollständig durch Knorpelgewebe nach 6 Wochen ersetzt wurde. Nach Abheilen der Wundverhältnisse war das Kind beschwerdefrei und das Transplantat komplikationslos eingewachsen [75].

Vielversprechende in-vivo Versuche im Tiermodell, aber auch erfolgreiche Anwendungen in der Klinik, machen die demineralisierte Knochenmatrix zu einem interessanten und hoffnungsvollen Trägermaterial nicht nur für die Kultivierung von Knochengewebe, sondern auch für Chondrozyten. Der dreidimensionale, poröse Aufbau, die hohe Biokompatibilität und Resorbierbarkeit und jahrelange klinische Erfahrungen mit DBM im Bereich der Orthopädie/Unfallchirurgie scheinen ideale Voraussetzungen zu sein, um dieses Trägermaterial im Tissue Engineering für humane Knorpelzellen zu verwenden.

Bislang gibt es jedoch nur wenige Arbeiten, die dieses Biomaterial für die Bildung von humanem Ersatzknorpel beschreiben [75, 76]. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die demineralisierte Knochenmatrix als Trägermaterial im Tissue Engineering von humanen Chondrozyten des Nasenseptums genauer untersucht werden.

1.4. Herleitung der Aufgabenstellung

Ziel der interdisziplinären Tissue Engineering-Arbeitsgruppe, in Zusammenarbeit mit der Gewebebank (Institut für Transfusionsmedizin Charité, Berlin), ist es, humane demineralisierte Knochenmatrix als Trägermaterial im Tissue Engineering von Knorpelgeweben in vitro zu etablieren.

Eine ausreichend hohe Zellzahl ist maßgeblich für die Bildung einer interzellulären Matrix [77] und der anschließenden Proliferation der Knorpelzellen [78] in einem Biomaterial notwendig. Des Weiteren verringern die Zellen durch die Dedifferenzierung in der Monolayerkultur, aber auch durch insuffiziente interzelluläre Kontakte, ihre Teilungskapazität und ihre chondrozytenspezifische Matrixproduktion [17]. Eine Studie hat genau dieses Phänomen untersucht [78]. So benötigen Chondrozyten eine hohe Zelldichte für die Ausbildung von ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten. Dies ermöglicht erst die Freisetzung von autokrinen Signalen, wie u.a. von Wachstumsfaktoren, die die Auslösung eines programmierten Zelltodes (Apoptose) verhindern. Bei einer zu geringen Zelldichte können die Chondrozyten nicht diese überlebenswichtigen autokrinen Signale in ausreichendem Maße produzieren, wodurch automatisch der programmierte Zelltod eingeleitet wird. Des Weiteren setzen Zellen, in denen die Apoptose eingeleitet wurde, ebenfalls wieder Todessignale frei, die den Zelltod der anderen Zellen zur Folge haben. [78, 79]. Eine hohe Zelldichte, die viele Zell-Zell-Kontakte ermöglicht, ist mit einer hohen Produktionsrate von extrazellulärer Matrix durch die Chondrozyten und der Expression eines chondrozytentypischen Phänotypes assoziiert [80].

Aber auch die Oberflächenbeschaffenheit und die Porengröße des Trägermaterials sind entscheidend für die Integrität der Chondrozyten in das Biomaterial, für die Ernährung und die Ausbildung von Zellkontakten [30]. Die demineralisierte Knochenmatrix hat eine sehr großporige Oberflächenbeschaffenheit (Abbildung 3) und könnte dadurch zum „Durchfallen“ der Chondrozyten und folglich zum Verlust der lebenswichtigen Zell-Zell-Kontakte führen. Dies kann nicht nur zu einer Verminderung der Proliferation, sondern auch zur Einleitung des programmierten Zelltodes führen.



**Abb. 3: Oberfläche der demineralisierten Knochenmatrix (DBM) nach Rehydrierung im Zellkulturmedium
Vergrößerung: 4fach**

Die Anforderungen an ein Biomaterial für das Tissue Engineering in der Kopf-Hals-Chirurgie sind vielfältig. Eine gute dreidimensionale Oberflächenbeschaffenheit, die das Einwachsen von Zellen und deren Versorgung mit Nährstoffen ermöglicht, Formstabilität, unkomplizierte Handhabung und einfache Herstellung bzw. Rekrutierung des Biomaterials sind nur einige der Voraussetzungen, die ein Trägermaterial im Tissue Engineering erfüllen muss. Des Weiteren dürfen während der in-vitro-Kultivierung und der Degradationsphase in vivo keine toxischen Substanzen aus dem Biomaterial freigesetzt werden [37]. Es ist denkbar, dass proliferationshemmende oder sogar toxische Einflüsse, die von der DBM selbst ausgehen, das Knorpelwachstum hemmen könnten oder sogar zum Zelltod führen. Denn zur Herstellung einer antigenen und keimfreien Knochenmatrix wird die DBM unter anderem mit Chloroform und Peressigsäure (PES) aufgearbeitet [63, 64]. Restbestände könnten in die Zellkultur freigesetzt werden und einen wachstumshemmenden bzw. zellschädigenden Effekt auf die Knorpelzellen haben. So wurde in aktuellen Studien der Verdacht auf einen toxischen, zellschädigenden bzw. proinflammatorischen Effekt der DBM auf Knorpelzellen in in-vitro-Experimenten geäußert [81-84]. Diese Effekte lagen hauptsächlich in den verschiedenen Aufarbeitungs- und Darreichungsformen der demineralisierten Knochenmatrix begründet. So zeigte DBM, welche mit Glycerol als Kittsubstanz gekoppelt war (Osteotech, Demineralized bone matrix Grafton putty), dosisabhängige toxische Effekte auf thymusaplastischen Ratten. Neben Wundheilungsstörungen konnten sehr hohe Dosen zu Tubulusnekrosen in den Nieren oder sogar zum Tod des Versuchstieres führen [81]. Toxische Effekte von Glycerol sind bei höheren Dosen auch für den Menschen bekannt. Neben direkt schädigenden Effekten auf die Nervenzellen und das Skelettmuskelsystem kann es auch sekundär zum Nierenversagen führen. Dies führte zur Dosisbegrenzung von DBM, welche mit Glycerol versetzt ist [81]. Eine weitere Studie zeigte einen Anstieg von Wasserstoffionen (H^+) in

vitro nach Zugabe von DBM [82]. Eine Erklärung für den Abfall des pH-Wertes könnte u.a. die Aufarbeitung der DBM mit Salzsäure (HCl) sein. Ein deutlicher Anstieg von H⁺-Ionen kann für die Induktion des Zelltodes verantwortlich sein [82].

Kalziumsulfat-basierende demineralisierte Knochenmatrix führte in der klinischen Anwendung in der Unfallchirurgie zu einer hohen Rate von Infektionen (54% der Patienten) und Wundheilungsstörungen, und 46% der Patienten mussten einer erneuten chirurgischen Intervention mit Entfernung der DBM unterzogen werden [83].

Unter Berücksichtigung der publizierten Untersuchungen bezüglich toxischer Effekte der DBM und der erforderlichen Zelldichte soll in dieser Arbeit zunächst analysiert werden, ob eine Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten in vitro möglich ist.

Die Besiedlung erfolgt über einen Zeitraum von 28 Tagen. Anschließend erfolgen die Untersuchung der Zellmorphologie histologisch mittels HE- und Alcianblaufärbung und die Untersuchung der Dedifferenzierung und Kollagensynthese (Kollagen I und II) immunhistochemisch und mittels Western-Blot-Analysen.

Sollte die Besiedlung der DBM schlecht funktionieren, dann muss im Anschluss analysiert werden, ob die großporige Struktur der DBM zum Verlust von Zellkontakten und damit zum Zelltod führt oder gar proliferationshemmende oder toxische Einflüsse der DBM auf die Chondrozyten wirken und eine schlechte Kultivierung und das Absterben der Zellen bedingen. Die folgenden Fragestellungen sollen dann geklärt werden:

(A) Welchen Einfluss hat die vorherige Bildung einer dreidimensionalen Zellstruktur in Form von Makroaggregaten auf die sich anschließende in-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten in der DBM?

In dieser Untersuchung werden zunächst Makroaggregate aus Chondrozyten gebildet und diese geformte Zellstruktur auf die DBM gegeben und für 14 Tage inkubiert. Damit wird den Knorpelzellen vor Gabe auf die DBM die Möglichkeit gegeben, eine ausreichende Menge an extrazellulärer Matrix zu produzieren und interzelluläre, lebensnotwendige Kontakte aufzubauen. Danach erfolgt erst das Auftragen der Chondrozyten auf die DBM. Anschließend erfolgt die histologische (HE- und Alcianblaufärbung) und immunhistochemische Auswertung (Kollagen I, II und Caspase III) der Proben.

(B) Kommt es durch die Sterilisation und Aufarbeitung der DBM zur Freisetzung von Restbeständen von Chloroform und Peressigsäure aus dem demineralisierten Knochen während der Kultivierung?

Die Aufarbeitung der DBM u.a. mit Chloroform und Peressigsäure [63, 64], nach der Entnahme aus der Leiche, kann Probleme bei der Kultivierung, eine verminderte Wachstumsrate oder sogar den Zelltod erklären. Deshalb soll neben einer gaschromatographischen Analyse des Zellkulturmediums auf Chloroform der Peressigsäuregehalt kolorimetrisch analysiert werden.

(C) Gibt es toxische oder proliferationshemmende Effekte der DBM auf die Chondrozyten?

In einem gesonderten Versuchsarm sollen Zytotoxizitäts- und Proliferationsuntersuchungen der DBM-exponierten Chondrozyten mittels des ELISA-Verfahren durchgeführt werden. Die Vitalität der Chondrozyten in der demineralisierten Knochenmatrix wird zusätzlich mit einer Lebend-Tot-Darstellung fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Auf eine Zugabe von Adhäsions-, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wird bewusst verzichtet, um ausschließlich die Interaktion der humanen Chondrozyten mit der demineralisierten Knochenmatrix beobachten zu können.

Eine schematische Darstellung der zeitlichen und inhaltlichen Abläufe der vorliegenden Arbeit zeigt die Abbildung 4.

2. Methodik und Materialien

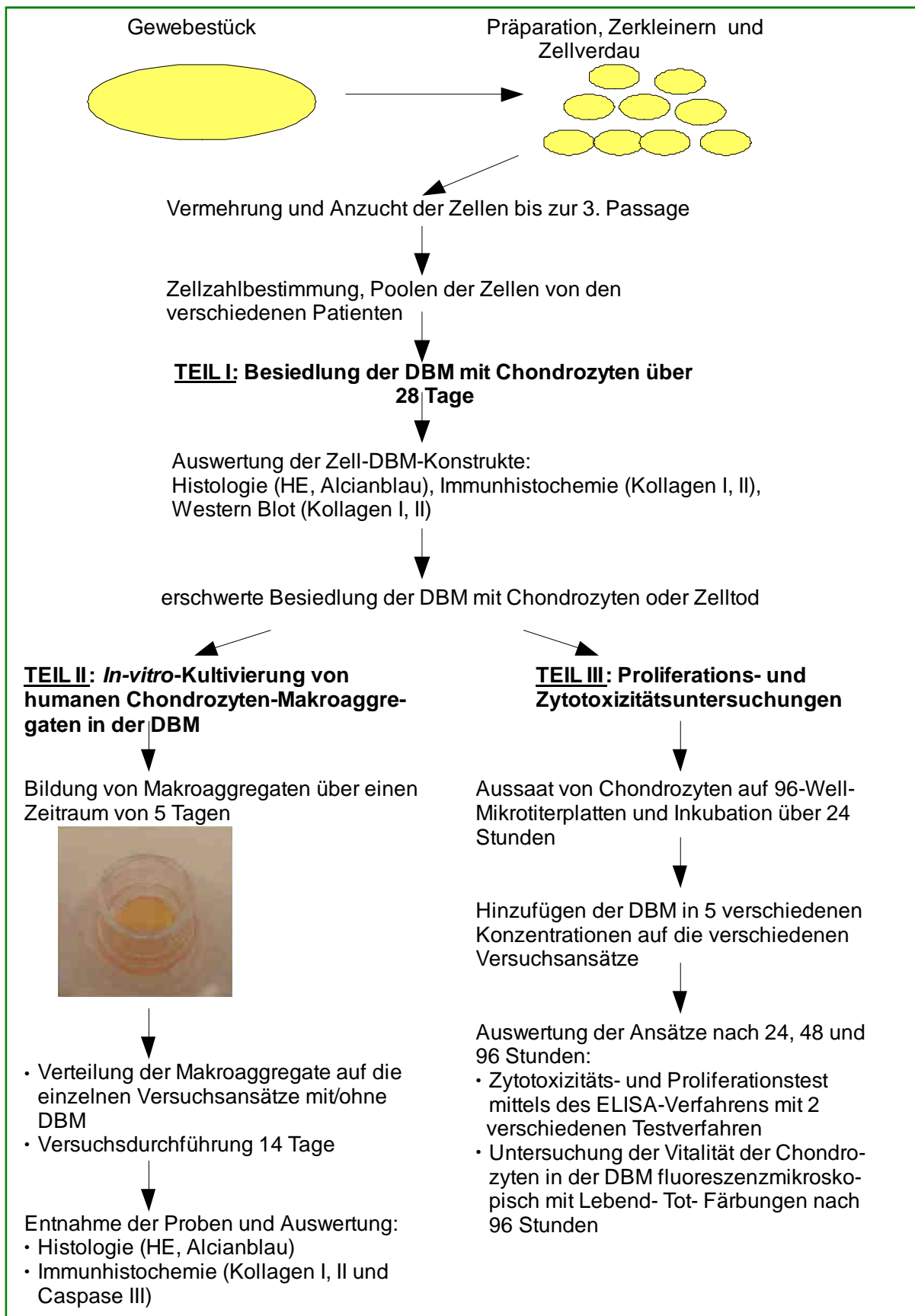


Abb. 4: Schema der zeitlichen und inhaltlichen Abläufe der Versuche

2.1. Materialien und allgemeine Durchführung

2.1.1. Humane Spender-Chondrozyten aus dem Nasenseptum

Verwendet wurden humane Chondrozyten aus dem Nasenseptum von Spendern, die sich einer korrigierenden Nasenseptumoperation unterzogen (Ethikantrag EA4/050/06 vom 04.09.2006). Insgesamt wurden Knorpelstücke von 22 Spendern (16 männliche, 6 weibliche Spender) im Alter von 20 und 59 Jahren (mittleres Alter 39,6 Jahre) verwendet (detaillierte Spenderauflistung siehe Tabelle 10, S. 50).

2.1.2. Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM)

Als Trägermaterial wurde humane demineralisierte Knochenmatrix aus der Spongiosa von Femur und Tibia von einem Spender verwendet, welche auch kommerziell für den Gebrauch am Patienten erhältlich ist. Die Aufarbeitung erfolgte durch das Institut für Transfusionsmedizin – Abteilung Gewebekbank – Universitätsmedizin Charité, Berlin. Die Spongiosa wurde nach Entnahme von einer Leiche in 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große und ca. 0,320g schwere Würfel geschnitten und entfettet mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:2). Nach anschließender Entkalkung mit Salzsäure (HCl) über 24 Stunden, Pufferung und Behandlung mit Peressigsäure erfolgte die abschließende Lyophilisierung (Gefriertrocknung) [64].

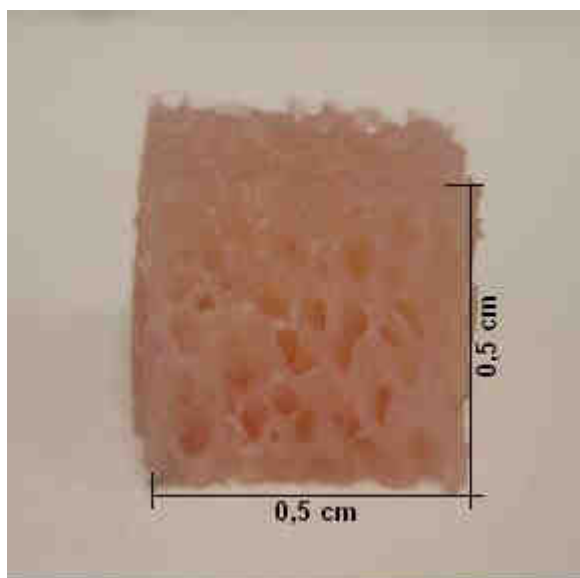


Abb. 5: Würfel aus demineralisierter Knochenmatrix (DBM)

2.1.3. Präparation und Verdau von Nasenseptumknorpel

Für die meisten Verfahren auf dem Gebiet des Tissue Engineering im Bereich der Kopf- und Halschirurgie wird der native Knorpel bei Septo- bzw. Septorhinoplastiken gewonnen [21, 44, 85]. Um eine Austrocknung und eine Infektion des Gewebes nach Entnahme zu vermeiden, wurde der Knorpel in 0,9% NaCl (Braun) + 2% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)–Lösung bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C steril aufbewahrt.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Knorpelstück von Bindegewebe frei präpariert und mit PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline solution without Calcium/Magnesium, Biochrom AG) dreimal gewaschen und in 1x1mm kleine Stücke geschnitten. Anschließend erfolgte der enzymatische Vorverdau zur Entfernung von bindegewebigen Strukturen bei 37°C mit Pronase (Roche) über eine Stunde. Der Knorpelverdau wurde dann mit Collagenase II (Biochrom AG, CLS II) bei 37°C in einem externen Rührbad bei 100rpm zwischen 4 – 6 Stunden durchgeführt. Dieser Vorgang ermöglichte die Herstellung von einer Zellsuspension mit einzelnen Chondrozyten. Nach Filtration durch einen Cellstrainer (0,2µm, BD Falcon) und Zentrifugation (Hettich, Universal 32R) bei 500rpm über 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zellzählung mittels Trypanblau (Biochrom AG) in der Neubauer-Zählkammer (Hämatozytometer) und die Aussaat in Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit einer Dichte von 35×10^3 bzw. das Einfrieren von nicht sofort benötigten Zellen.

2.1.4. Einfrierprozedur für Knorpelzellen

Um eine ausreichend hohe Zellzahl für den Versuch zu haben, wurde ein Teil der Proben verdaut und eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut. Der Verdau wurde wie beschrieben durchgeführt und nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen bei 3000rpm über 3 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und das Zellpellet in ca. 1,5ml Einfriermedium aufgenommen (für 2ml: 1400µl DMEM (Biochrom AG), 400µl FCS (Biochrom AG) und 200µl DMSO (Roth)). Sofort wurde der Cup (Roth) in einem speziellen Cryo

Freezing Container (Nalgene™) bei -80°C eingefroren und nach 24 Stunden in Stickstoff überführt.

Für diesen Versuch wurden die Cups mit den Zellen in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in ein 15ml Röhrchen (Sarstedt) überführt und nach Zugabe von etwas Medium bei 3000rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand mit dem restlichen Einfriermedium abpipettiert und verworfen werden. Die Zellen wurden dann auf Zellkulturflaschen mit frischem Zellkulturmedium verteilt.

2.1.5. Zellkulturmedium (CGM)

Zusatz	Konzentration	Firma
DMEM/HAM's	1:1	Biochrom AG
FCS	10%	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	1%	Biochrom AG
Patricin	1%	Biochrom AG
MEM AS	1%	Biochrom AG
L-Ascorbic Acid	1%	Biochrom AG
L-Glutamin	1%	Biochrom AG

Tab. 3: Zusammensetzung Zellkulturmedium (CGM)

2.1.6. Amplifizierung von Monolayerkulturen (Trypsinieren und Passagieren)

Bei einer Zelldichte in den Zellkulturflaschen von 70-80% wurden die Zellen mit PBS + 1% Penicillin/Streptomycin dreimal gespült. Das Trypsinieren erfolgte mit 1% Trypsin/EDTA (Biochrom AG) für ca. 2 Minuten und führte zum vollständigen Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen sowie zum Auflösen von Zell-Zell-Kontakten. Durch die Hinzugabe von Zellkulturmedium wurde diese enzymatische Reaktion gestoppt. Die Lösung mit den Zellen wurde in 50ml Falconröhrchen überführt und anschließend bei 3000rpm über 3 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in Medium aufgenommen und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und mit 10ml frischen CGM versorgt. Die Größe dieser Kulturflaschen wurde nach der Anzahl der verfügbaren Zellen ausgewählt. Für den Versuch wurden die Chondrozyten in der 3. Passage verwendet.

2.1.7. Zellzählung mit der „Neubauer-Zählkammer“

Nach dem Verdau bzw. dem Trypsinieren wurde das Zellpellet in dem 10fachen Volumen der Pelletgröße in CGM aufgenommen, 20µl der Zelllösung in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 20µl 0,5% Trypanblau (Biochrom AG) hinzugegeben. Davon wurden 20µl in eine „Neubauer-Zählkammer“ gegeben, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und mittels Dreifachbestimmung die Zellzahl ermittelt.

2.1.8. Zellkultivierung

Nach Aussaat der Chondrozyten (nach dem Auftauen, Verdau bzw. dem Passagieren) in die Zellkulturflaschen (Sarstedt) wurden diese in einem Zellkulturschrank (Heracell 150, Kendro) bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte alle 2-3 Tage ein Wechsel des Zellkulturmediums.

2.2. Teil I: Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten

Die benötigten Chondrozyten wurden bei korrigierenden Nasenseptum-Operationen gewonnen. Nach Verdau mit Collagenase-II und einer Vitalitäts-Zellzahlbestimmung wurden die Zellen auf Zellkulturflaschen ausgesät und unter Zellkulturbedingungen (37°C und 5% CO₂) angezogen. Nach Kultivierung der Zellen bis zu einer Konfluenz von 90% in der zweiten Passage erfolgte eine Trypsinierung und Zellzählung.

Für eine ausreichend hohe Zelldichte wurden drei verschiedene Zellkonzentrationen gewählt und die DBM mit 500.000, 1 Million und 5 Millionen Chondrozyten besiedelt. Die entsprechende Zellmenge wurde mit 100µl Zellkulturmedium aufgenommen, auf die Oberfläche der für 30 Minuten in Zellkulturmedium rehydrierten DBM aufgebracht und in Zellkulturplatten bei 37°C, 5% CO₂ über einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert. Um ein „Durchfallen“ der Chondrozyten durch die großporige DBM in die Zellkulturschalen zu verhindern, wurde die DBM vor Zugabe der Knorpelzellen auf einen Nitrozellulosefilter, der sich auf einer Zellkulturbrücke aus Stahl befindet, in die Zellkulturschalen gestellt. Die Versorgung der Zellen wurde über die Diffusion des Zellkulturmediums über den Filter gewährleistet, indem das Medium bis an den Oberrand der Zellkulturbrücke pipettiert wurde. Nach 2 Tagen Inkubation war davon auszugehen, dass die Chondrozyten angewachsen waren und die Würfel wurden direkt in die Schalen gestellt, um eine noch optimalere Versorgung der Zellen in der DBM zu erreichen (siehe Abb. 6 und 7).

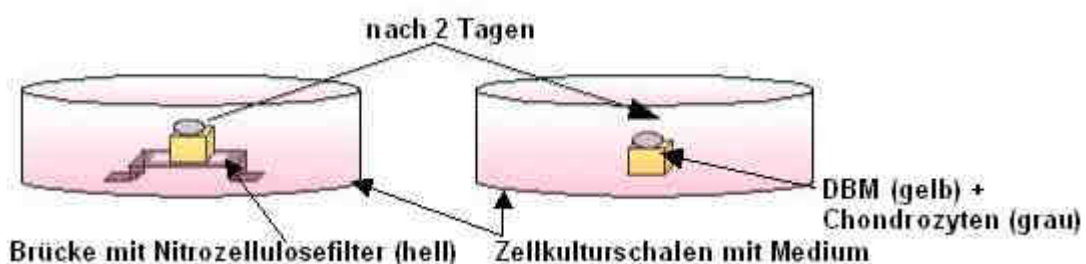


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

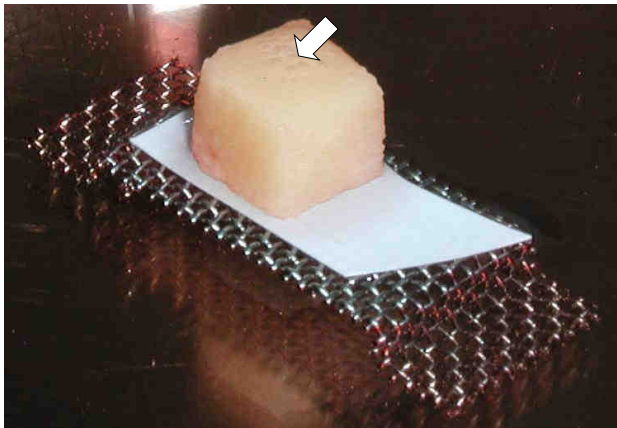


Abb. 7: Brücke mit Nitrozellulosefilter und rehydriertem Würfel aus DBM mit oben aufgebracht Zellsuspension(⇒) am Tag 0.

Um eine Dedifferenzierung der Chondrozyten [28] genauer verifizieren zu können, wurden als Kontrolle Fibroblasten verwendet. Diese wurden aus humaner Vorhaut, (23jähriger Patient) die bei Zirkumzisionen anfiel, gewonnen, mit Trypsin verdaut, bis zur zweiten Passage kultiviert und nach Zellzählung in den gleichen Konzentrationen wie die Chondrozyten auf die DBM gebracht. Die Kultivierung der Fibroblasten auf der DBM erfolgte analog zu der Besiedlung der DBM mit Chondrozyten über einen Zeitraum von 28 Tagen. Es wurden Dreifachansätze durchgeführt.

2.2.1. Auswertung

Nach 28 Tagen wurden die Würfel mit den Zellen entnommen und halbiert. Die eine Hälfte wurde für histologische und immunhistochemische Analysen verwendet und die andere Hälfte für Western-Blot-Analysen weiterverarbeitet.

2.2.1.1. Histologie

Die Proben wurden zur Fixierung für 15 Minuten in 4% Paraformaldehydlösung (Roth) gegeben und anschließend mit PBS gewaschen. Zum Schutz der Zellen beim Einfrierprozess erfolgte eine Kryoprotektion mit 30%iger Sucroselösung (Sigma-Aldrich) über einen Zeitraum von 2-3 Stunden. Durch die Anlagerung der nicht-penetrierenden Zuckermoleküle konnten die Zellen vor Kälteschäden geschützt werden [86]. Danach wurden die Proben vorsichtig in TissueTek® Cryomold

Intermediate mit TissueTek® O.C.T. Compound Containing luftblasenfrei eingebettet. Eingefroren wurden die Proben in -60°C kalten Hexan und anschließend bei -80°C gelagert. Für die histologische und immunhistologische Auswertung wurden $7\mu\text{m}$ -Schnitte mittels eines Cryotoms angefertigt und auf Objektträger (R. Langenbrick, Super Frost® Plus) gezogen. Die Präparate wurden nach den Färbungen mit einem Lichtmikroskop (Olympus CK40) ausgewertet und mittels Digitalkamera (Olympus Camedia C-3030) fotografiert. Von jeder Färbung wurden 10 Objektträger mit je 2 Schnitten ausgewertet.

A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Als Übersichtsfärbung wurde die HE-Färbung verwendet. Sie dient der Darstellung aller basophilen Zell- und Gewebestrukturen (Chromatin der Zellkerne, einige Zytoplasmabestandteile) mit blauer, sowie der azidophilen Bestandteile mit roter Anfärbung [87].

Dazu wurden die aufgetauten Schnitte für 10 Sekunden in Aceton (J.T.Baker) gestellt und nach dem Spülen mit Leitungswasser für 1 Minute mit Hämalan nach Harris (Roth) gefärbt. Anschließend erfolgte das Bläuen durch Spülen der Schnitte mit Leitungswasser. Ein weiterer Färbeschritt mit Eosin (Roth) für 15 Sekunden folgte. Die Entwässerung des Präparates erfolgte durch dreimaliges Tauchen der Objektträger in Aceton. Nach Klären des Schnittes mit dem organischen Lösungsmittel Xylol (Roth) wurde der Objektträger mit Roti®-Histokitt II und einem Deckglas (Menzel Glaser, 24x60mm) eingedeckelt.

Zellkerne, Nukleolen, Mitochondrien	- blau
Zytoplasma	- rosa bis rot

B) Alcianblau-Färbung

Die Alcianblau-Färbung dient dem Nachweis von für das Knorpelgewebe charakteristischen Glykosaminoglykanen und von negativ geladenen sulfatierten Proteoglykanen, die ein Hinweis auf eine stattgefunden chondrogene Differenzierung sind.

Dazu wurden die aufgetauten Schnitte für ca. 2 Minuten in Aqua dest. gewaschen und für 3 Minuten in 1% Essigsäure (Roth) gestellt. Danach folgte die 30minütige Färbung mit 1% Alcianblaulösung von einem pH-Wert von 2,5 (Roth,

0,5g Alcianblau wurden in 50ml 3% Essigsäure gelöst). Anschließend erfolgte das Abspülen der Färbelösung mit 3% Essigsäure und das Waschen des Präparates von 2 Minuten in Aqua dest. Der zweite Färbeschritt wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten mit Kernechtrot (Roth) durchgeführt. Nach Abwaschen der Färbelösung mit Aqua dest. erfolgten die Entwässerung des Schnittes mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Klären mit Xylol. Das Eindeckeln erfolgte mit Roti®-Histokitt II.

Saure Mukosubstanzen - leuchtend blau
 Zellkern - hellrot
 Zytoplasma - zartrosa

2.2.1.2. Immunhistochemie

Zur Visualisierung von spezifischen Gewebe- und Zellantigenen wie Kollagen I und II erfolgte die immunhistochemische Auswertung mit dem ZytoChem AP Kit (Broad Spectrum, AP-S125) von Zytomed. Die aufgetauten Schnitte wurden nach Rehydrierung mit PBS 20 Minuten mit 0,2% Triton X bei Raumtemperatur und danach für fünf Minuten mit SuperBlock®-Lösung zur Blockierung unspezifischer Antigene inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Spülen der Schnitte mit PBS. Danach wurden die spezifischen Antikörper gegen Kollagen I und II in spezifischer Verdünnung (siehe Tabelle 4) hinzugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Antikörper	Verdünnung	Firma
Kollagen I	1:50	Acris, R1038
Kollagen II	1:200	Acris, R1039X

Tab. 4: Primäre Antikörper - Immunhistochemie

Am darauffolgenden Tag wurden Antikörperrückstände durch Spülen mit PBS entfernt und für 15 Minuten der biotinylierte Brückenantikörper (Sekundärantikörper) aufgetragen. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat für ebenfalls 10-15 Minuten zugefügt, welches an den Biotinrest des Brückenantikörpers bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wurde

durch Hinzugeben der Chromogenlösung Fast Red in Naphthol-Phosphat-Puffer für ca. 5-10 Minuten eine enzymatische Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase gestartet, in deren Verlauf sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein roter Farbniederschlag bildete, der im Lichtmikroskop sichtbar wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Harris. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt, die zuvor bei 37°C erwärmt wurde. Von jedem Ansatz wurden 10 Objektträger mit je zwei Schnitten ausgewertet.

Beschreibung der einzelnen Antikörper

- Kollagen I

Kollagen I ist das häufigste Kollagen im menschlichen Körper und kommt ubiquitär u.a. in der Haut, in Sehnen, Knochen, Dentin, Faszien, Organkapseln, aber nicht im Knorpel vor [20]. Um eine mögliche Dedifferenzierung der Chondrozyten nachweisen zu können, wurden in der immunhistochemischen Färbung Antikörper gegen Kollagen I verwendet.

- Kollagen II

Kollagen II ist das typische fibrilläre Kollagen des Knorpels. Zur deutlichen Unterscheidung von Knorpelzellen und Bindegewebszellen wurden in den immunhistochemischen Färbungen Antikörper gegen Kollagen II verwendet.

2.2.1.3. Western-Blot-Analysen

Die Methode des Western Blot ermöglicht den Nachweis von wichtigen Proteinen der Chondrozyten. Geprüft wurde das Vorhandensein von Kollagen I und Kollagen II.

A) Vorbereitung der Proben

Nach Entnahme der Proben nach 14 Tagen wurden diese in 1ml Lysispuffer (1% Triton X, 1% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS, 150mmol NaCl, 50mmol Tris-HCl mit pH 7,5, 5µl Pepstatin und 10µl PMSF) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000rpm für 30 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

B) Proteinbestimmung und -konzentrierung

Die Bestimmung der Proteinmengen erfolgte nach der Methode nach Bradford mittels Roti®-Nanoquant (Roth).

Zur Herstellung einer einheitlichen Menge von 100µg Protein pro Ansatz wurden die Proben auf ein einheitliches Volumen von 900µl gebracht und das Protein mit eiskalter 20% Trichloressigsäure (Roth) für 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C, 10000rpm über 30 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, verworfen und 400µl eiskaltes Aceton hinzugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Aceton abgenommen und evtl. Rückstände bei Raumtemperatur verdampft. Das Proteinpellet wurde dann mit 50µl Roti®-Load1 (Verdünnung 1:4) aufgenommen und bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Bis zur Weiterverarbeitung der Proben wurden diese bei -6°C aufbewahrt.

C) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ziel der Gelelektrophorese war die Auftrennung der einzelnen Proteinfractionen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Mini Protean II von BioRad). Die Proteine (20µl pro Ansatz) wurden in einem Polyacrylamid-Sammelgel (4 %) konzentriert und über ein Polyacrylamid-Trenngel (5 %) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Laufzeit betrug zunächst 15 Minuten bei 80V und anschließend 60 Minuten bei 120V. Die Gelherstellung (Tab. 5) und die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgten nach den Angaben von BioRad. Nach der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig auf PVDF-Membranen (BioRad) geblottet. Dieser Transfer erfolgte ebenfalls mittels eines Mini Protean II von BioRad bei 120V über 90 Minuten und Kühlung.

Zusätze	Trenngel 5%	Sammelgel 4%
30% Acrylamid (BioRad)	1,65ml	670µl
1 M Tris pH 8,8 (Roth)	2,5ml	-
1 M Tris pH 6,8 (Roth)	-	1,25ml
20% SDS (Roth)	50µl	25µl
H ₂ O	5,7ml	3,0ml
5% APS (BioRad)	100µl	50µl
TEMED (BioRad)	10µl	10µl

Tab. 5: Herstellung der Gele für die Gelelektrophorese – Western Blot

D) Blockierung und Antikörper-Bestückung

Nach Beendigung des Transfers wurden die PVDF-Membranen vorsichtig in 50ml Röhrchen (Falcon) überführt und je Membran 20ml Blockierungspuffer (Roti®Block, Verdünnung 1:10) hinzugegeben. Die Blockierung erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schwenker. Anschließend wurde der Blockierungspuffer verworfen.

Je 10ml der entsprechenden Antikörper-Verdünnung (siehe unten) wurden auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 x 5 Minuten mit dem Blockierungspuffer gewaschen und der sekundäre polyklonale Antikörper (anti-rabbit, Millipore, Verdünnung von 1:2500) 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Membranen mit 20ml Tris (1fach, Roth).

Polyklonaler Antikörper gegen Kollagen I: Verdünnung: 1:1000 (Acris)

Polyklonaler Antikörper gegen Kollagen II: Verdünnung: 1:1000 (Acris)

E) Detektion der Proteinbanden und Auswertung

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit einer NBT/BCIP-Lösung (Roche). Dafür wurden 25ml dieser Lösung auf die Membranen gegeben und diese im Dunkeln je nach Antikörper 15-30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt, die Membranen im Dunkeln getrocknet, anschließend gescannt und mittels eines Computerprogrammes (BioRad, Quantify One) ausgewertet.

2.3. Teil II: In-vitro-Kultivierung von Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM

2.3.1. Herstellung eines Makroaggregates

Die Herstellung eines dreidimensionalen Gefüges in Form von Makroaggregaten erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Naumann und seinen Kollegen [88]. Die sich in einer Monolayerkultur befindenden Zellen wurden nach der 2. Passage trypsiniert, in ein 50ml-Röhrchen gegeben und ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen bei 3000rpm für 3 Minuten auf den Boden des Röhrchens zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Zur späteren Vergleichbarkeit der weiter unten beschriebenen einzelnen Ansätze wurde die gleiche Zellzahl von 12 Millionen Chondrozyten pro Ansatz verwendet. Diese Zellmenge, gelöst in 350µl CGM, wurde in die entsprechenden Zellkulturinserts (Millicell®-PCF, 8µm) überführt (siehe Abb. 6) und diese Inserts in Zellkulturschalen (Sarstedt, 100x20mm) mit 10ml CGM gestellt. Die Inkubation fand bei 37°C und 5% CO₂ statt. Der Mediumwechsel erfolgte auch hier alle 2-3 Tage. Nach 5 Tagen war nach eigenen Vorversuchen davon auszugehen, dass die Chondrozyten eine knorpelgewebeähnliche solide Struktur (Makroaggregate) gebildet hatten, so dass diese für den weiteren Versuch verwendet werden konnten.

2.3.2. Aufbau und Durchführung des Versuches

Zur Untersuchung des Einflusses einer dreidimensionalen Zellstruktur (Makroaggregate) auf die in-vitro-Kultivierung in der DBM und zur Untersuchung einer möglichen chondrozytenschädigenden Wirkung des humanen demineralisierten Knochens wurde der Versuch mit sechs verschiedenen, parallel durchgeführten Ansätzen mit gepoolten Chondrozyten über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt (siehe Tabelle 6).

Ansatz	Beschreibung
1	Zellkulturmedium pur (=CGM, Negativkontrolle für gaschromatographische Analyse)
2	Chondrozyten-Makroaggregat (Positivkontrolle)
3	DBM (Negativkontrolle)
4	DBM + Chondrozyten-Makroaggregat
5	Chondrozyten-Makroaggregat + CGM von Ansatz 3
6	Chondrozyten-Makroaggregat + CGM von Ansatz 4

Tab. 6: Beschreibung der Versuchsansätze; CGM = Zellkulturmedium

In der Auswertung des Experimentes sollte eine kolorimetrische und gaschromatographische Analyse des Zellkulturmediums erfolgen, um eine evtl. Freisetzung von Chloroform und Peressigsäure (näheres siehe unten) in das Medium (CGM) zu untersuchen. Dafür wurde als Negativkontrolle normales CGM in Ansatz 1 unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Ansätze kultiviert.

Als Positivkontrolle für das normale Proliferationsverhalten wurden Chondrozyten über den gleichen Zeitraum ohne DBM kultiviert (Tab. 6, Ansatz 2.).

Ansatz 4 stellte die Besiedlung der DBM mit einem Chondrozytenmakroaggregat dar. Um eine mögliche proliferationshemmende bzw. toxische Wirkung der DBM z.B. durch Freisetzung von PES oder Chloroform unabhängig von der großporigen Struktur der DBM genauer untersuchen zu können, erhielt Ansatz 5 (Chondrozyten-Makroaggregat) das Medium des Ansatzes 3 und Ansatz 6 (Chondrozyten-Makroaggregat) das Medium des Ansatzes 4 (Abb. 8). Letzteres sollte untersuchen, ob eventuell erst die Besiedlung der demineralisierten Knochenmatrix mit Zellen zur Freisetzung von schädlichen Substanzen führte. Als Negativkontrolle wurde nicht mit Zellen besiedelte DBM über den gleichen Zeitraum in Kultur beobachtet.

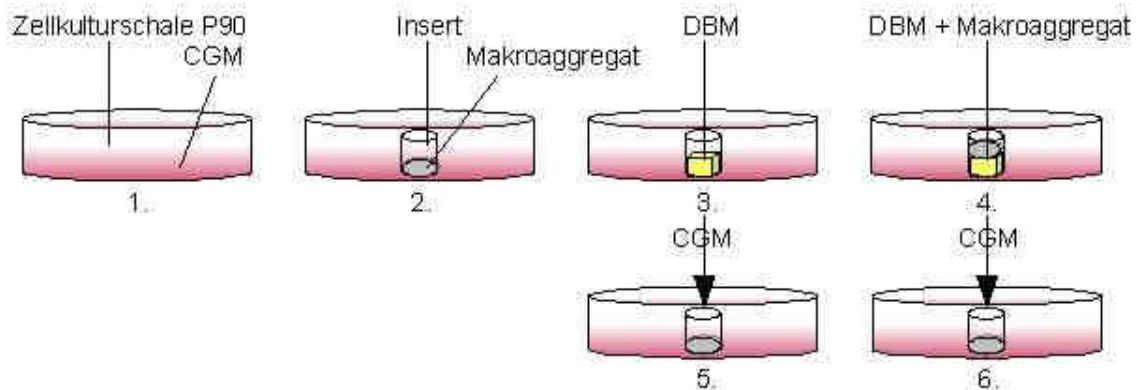


Abb. 8: Schema Versuchsaufbau; CGM = Zellkulturmedium

Die verschiedenen Knorpelproben der einzelnen Spender wurden für eine ausreichend hohe Zellzahl gepoolt. Die Formung der Makroaggregate erfolgte wie beschrieben. Pro Ansatz 2, 4, 5 und 6 wurden 12 Millionen Zellen verwendet (siehe Abb. 8). Nach der Formung von makroskopisch sichtbaren Makroaggregaten wurden diese nach 5 Tagen vorsichtig aus den Inserts mit einem Skalpell geschnitten und auf die DBM in neue Inserts gegeben (siehe Abb. 9 und 10). Vorher wurden die Würfel aus der DBM für mindestens 30 Minuten bei 37°C/5% CO₂ in CGM rehydriert und in die entsprechenden Inserts überführt (siehe Abb. 9). Die Ansätze wurden ab diesem Zeitpunkt insgesamt über 14 Tage bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Alle 2 – 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums.

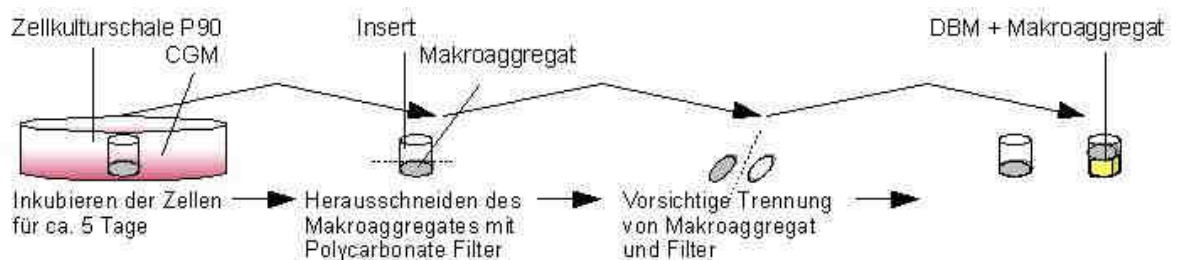


Abb. 9: Überführung eines Makroaggregates auf die DBM in ein neues Insert; CGM = Zellkulturmedium

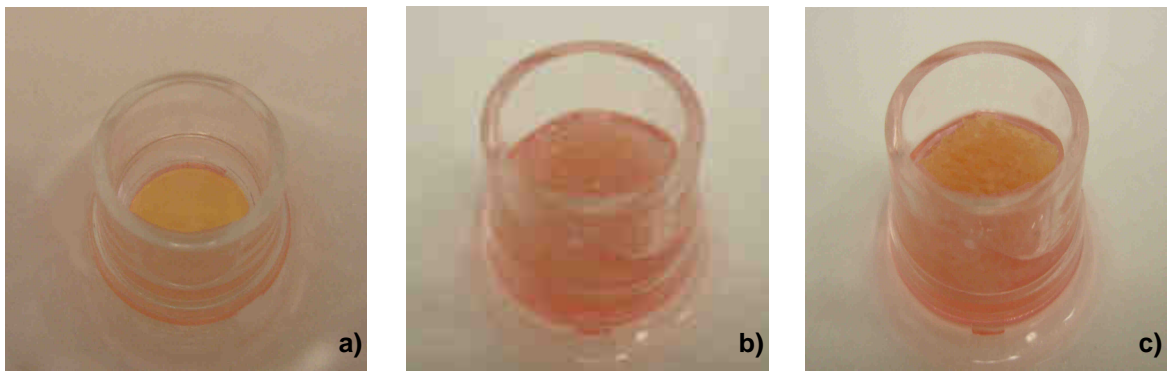


Abb. 10: Insert mit a) Chondrozyten, b) mit DBM und c) mit DBM + Chondrozyten

2.3.3. Auswertung

Neben den rein makros- und mikroskopischen Beobachtungen wurden während des Versuches der Peressigsäuregehalt bestimmt und zur Analyse des Mediums auf Chloroform vor jedem Mediumwechsel 1ml Medium/Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur Bestimmung bei -6°C aufbewahrt.

2.3.3.1. Bestimmung des Peressigsäure (PES)-Gehaltes

Die demineralisierte Knochenmatrix wird bei der Herstellung mit Peressigsäure behandelt, um immunogene Zellen und Zellbestandteile aus der Spongiosa herauszulösen [64]. Um eine Freisetzung von Rückständen von Peressigsäure auszuschliessen, wurde vor jedem Mediumwechsel der Gehalt im Zellkulturmedium kolorimetrisch mit Peressigsäure-Teststreifen (Merckoquant®) getestet. Peressigsäure reagiert mit einem aromatischen Amin zu einem blauen Farbstoff. Dafür wurde der Teststreifen für ca. 1 Sekunde in das abgenommene Zellkulturmedium getaucht. Anschließend wurde die Reaktionszone des Teststreifens sofort mit der Farbskala des Herstellers verglichen und der zugehörige Messwert abgelesen. Die Sensitivität dieser Methode ist jedoch gering und erfasst erst PES-Werte im mg-/ml-Bereich. Als Negativkontrolle diente das Zellkulturmedium aus dem Ansatz 1 (siehe Tab. 6, Abb. 8).

2.3.3.2. Gaschromatographie

Die Entfettung des Knochens zur Herstellung von DBM erfolgte mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol [64]. Auch Restbestände von Chloroform können proliferationshemmend und zelltoxisch auf die Chondrozyten wirken. Zur Bestimmung des Chloroformgehaltes erfolgte eine gaschromatographische Analyse der Medien. Eine Dreifachbestimmung wurde durchgeführt. Im Institut für Toxikologie (Oranienburgerstr. 285, 13437 Berlin, Hr. Dr. Birkhahn) wurden die Proben gaschromatographisch analysiert. Es wurden Dreifachbestimmungen exemplarisch nach 3, 9 und 14 Tagen durchgeführt.

2.3.3.3. Entnahme der Proben

Nach 14 Tagen in Kultur wurden die Proben entnommen. Die Inserts mit dem Makroaggregat bzw. DBM mit und ohne Makroaggregat wurden mit PBS (ohne Calcium/Magnesium) dreimal gespült, um Mediumrückstände aus den Proben zu entfernen. Anschließend wurden die Makroaggregate und die DBM mit und ohne Makroaggregat aus den Inserts entnommen und für die weitere histologische und immunohistochemische Auswertung vorbereitet.

2.3.3.4. Histologie

Die histologische Auswertung der Proben erfolgte analog zu der einfachen Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten (siehe Kap. 2.2.). Es wurden pro Ansatz 10 Objektträger mit je zwei 7µm dicken Schnitten untersucht und mit HE und Alcianblau gefärbt

2.3.3.5. Immunhistochemie

Zur Durchführung der Immunhistochemie wurden ebenfalls 10 Objektträger mit je zwei 7µm dicken Schnitten untersucht. Die Gewebeschnitte wurden

immunhistochemisch auf Kollagen I, II und Caspase III untersucht. Die genaue Durchführung der Färbung und die primären Antikörper Kollagen I und II wurden im Kapitel 2.2. erläutert.

Eine mögliche toxische Wirkung der demineralisierten Knochenmatrix auf die Knorpelzellen könnte zu einer Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) in den Zellen führen und damit auch zu einer Aktivierung von spezifischen Enzymen, z.B. Caspase III.

- Caspase III

Die Aktivierung einer Gruppe von Enzymen, den Caspasen, steht im Zentrum der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Ursachen für Apoptose sind neben DNA-Schäden durch UV-Strahlen und γ -Strahlen, auch Zytokine (TNF- α), Glukokortikoide, Infektionen durch Viren und andere toxische Substanzen. Caspasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum Cystein und spalten nach Aktivierung Peptidverbindungen hinter der Aminosäure Aspartat (Cysteinylasspartate-specific-protease) [89, 90]. Man unterscheidet mittlerweile eine ganze Reihe von Caspasen, die unterschiedliche Aufgaben haben und sich zum Teil gegenseitig aktivieren. Zum Auslösen des Zelltods werden Initiator-Caspasen, u.a. Caspase VIII und IX, aktiviert. Diese wiederum spalten die *pro*-(Vorläufer-) Form nachgeschalteter Effektor-Caspasen. Diese sind für die eigentlichen morphologischen Veränderungen der Zelle nach Induktion der Apoptose verantwortlich. Am wichtigsten ist hier in diesem Prozess die Caspase III, die u.a. das Kern- und Zytoskelett zerlegt (Spaltung von Aktin und Lamin), aber auch eine Desoxyribonuklease aktiviert, die im Rahmen der Apoptose die nukleäre DNA spaltet [89, 91].

Wenn die demineralisierte Knochenmatrix tatsächlich eine toxische Wirkung auf die Knorpelzellen hat, dann würde dies zur Induktion der Apoptose und somit auch zur Aktivierung von Caspase III führen. Somit dient der immunhistochemische Nachweis von Caspase III mittels Antikörper in den Präparatschnitten als ein wichtiges Kriterium zum Nachweis von Apoptosevorgängen.

Der primäre Antikörper Caspase III wurde in einer Verdünnung von 1:50 von der Firma R&D Systems (AF835) verwendet.

2.4. Teil III: Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchung

Zur Untersuchung bzw. zum Ausschluss einer möglichen proliferationshemmenden oder toxischen Wirkung der DBM auf die humanen Chondrozyten in vitro wurden zwei verschiedene Proliferations- und Zytotoxizitätstest durchgeführt und mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay = Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)) ausgewertet. Diese beiden Methoden zielen jeweils auf einen anderen Wirkungsmechanismus ab und werden im Folgenden genauer erläutert. Außerdem wurden parallel zu den ELISA- Untersuchungen Vitalitätsfärbungen der Chondrozyten mit und ohne DBM mittels der Lebend-Tot-Darstellung durch Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Berücksichtigt wurden in diesem Versuchsteil verschiedene Konzentrationen der demineralisierten Knochenmatrix und unterschiedliche Kultivierungszeiten (24, 48 und 96 Stunden).

2.4.1. Aufbau und Durchführung des Versuches

Zur Untersuchung einer möglichen toxischen Wirkung des demineralisierten Knochens (DBM) auf die Chondrozyten wurden analog zum Teil II des Experimentes sechs verschiedene Ansätze in 96-Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt) angesetzt. Alle Ansätze wurden als Doppelansatz durchgeführt.

Um eine dosisabhängige, proliferationshemmende bzw. toxische Wirkung der DBM zu berücksichtigen, wurden insgesamt fünf verschiedene Dosierungen der DBM getestet (siehe Tab. 7). Dazu wurden die Würfel gewogen und mit einem Skalpell zerkleinert und fünf verschiedene Dosierungen in die entsprechenden Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben.

Bezeichnung	Menge an DBM in Milligramm
C1	150
C2	100
C3	50
C4	20
C5	10

Tab. 7: Dosierungen von DBM

Die für diesen Versuch benötigten Chondrozyten wurden, wie bereits beschrieben, bis in die 2. Passage angezogen, trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat von 5000 Zellen in 100µl CGM pro Vertiefung in die 96-Well-Mikrotiterplatten. Um den Zellen die Möglichkeit des Anwachsens zu geben, wurden diese zunächst 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte eine mindestens 30minütige Rehydrierung der zerkleinerten demineralisierten Knochenmatrix mit CGM im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die verschiedenen Konzentrationen der DBM in die vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben. Die genaue Bestückung der Mikrotiterplatten veranschaulicht Abbildung 11. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten, nach 24, 48 und 96 Stunden, wurden der WST-1- und der BrdU-Test (siehe Kapitel 2.4.2. und 2.4.3.) durchgeführt. Für jeden Zeitraum und jeden Zytotoxizitäts- und Proliferationstest wurden separate Mikrotiterplatten mit Zellen und DBM verwendet. Außerdem wurde eine separate Mikrotiterplatte parallel für die Vitalfärbungen (Lebend-Tot-Darstellung) mit Chondrozyten und DBM in den verschiedenen Dosierungen bestückt und nach 96 Stunden ausgewertet. Von einer Vitalfärbung nach 24 und 48 Stunden wurde abgesehen, da davon ausgegangen werden konnte, dass diese Zeit zu kurz für die Chondrozyten ist, um in die demineralisierte Knochenmatrix hineinzuwachsen. Die genaue Durchführung der Vitalfärbungen wird im Folgenden unter 2.4.4. beschrieben.

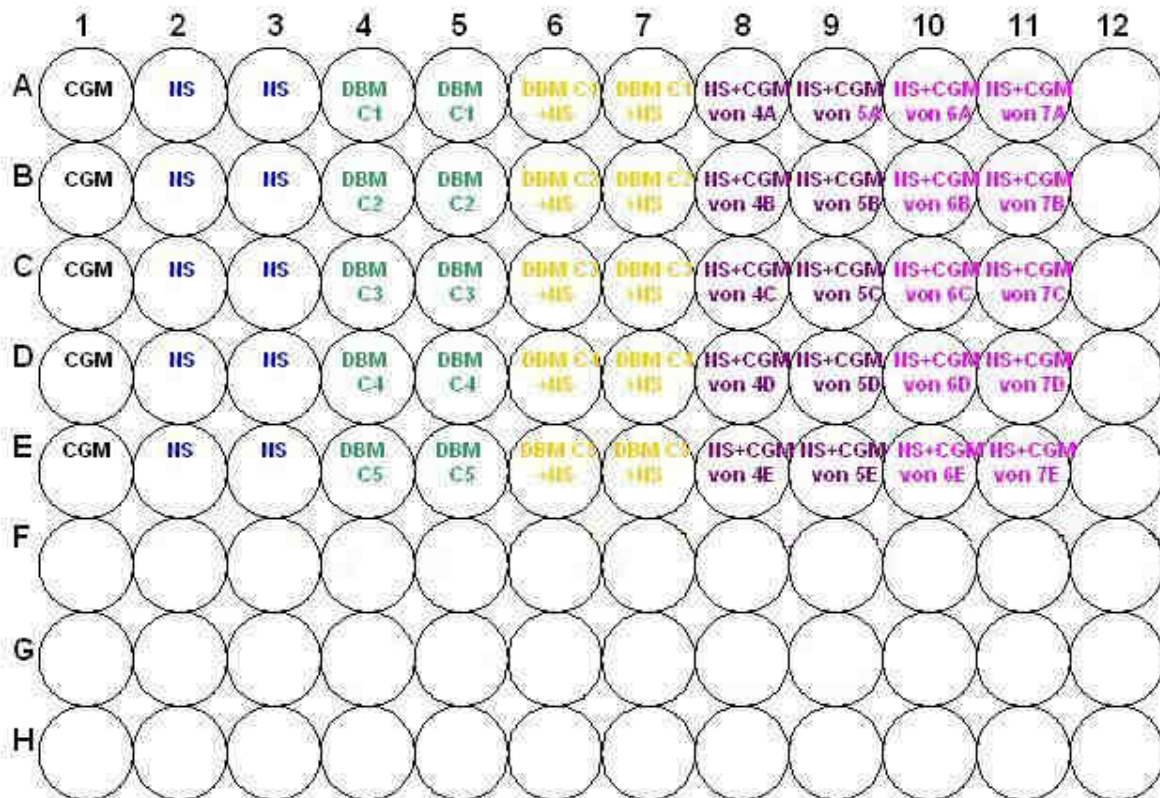


Abb. 11: Bestückung der 96-Well-Mikrotiterplatte (NS=Nasenseptumchondrozyten; C1-C5=verschiedene Konzentrationen der DBM; CGM = Zellkulturmedium)

2.4.2. Zellproliferationstest: WST-1-Test

Der WST-1-Test ist eine nicht-radioaktive Methode, um die Proliferation und Vitalität von Zellen zu quantifizieren. In dem Test wird die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen, dem Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, über die Umsetzung des leicht rötlichen WST-1-Reagenz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene-disulfat) zu dunkelrotem Formazan (siehe Abb. 12) gemessen. Die Farbveränderung, die zwischen 420 und 480nm mit einem ELISA-Reader gemessen werden kann, ist hierbei ein Maß für den Anteil von metabolisch aktiven Zellmitochondrien. Der WST-1 Test kann somit einerseits benutzt werden, um die Zellproliferation der Chondrozyten zu testen, andererseits auch als Nachweismethode von Zelltod dienen [92].

Zur Durchführung des WST-1-Tests wurde zunächst der demineralisierte Knochen aus den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten entfernt. Danach wurden 10µl WST-1-Reagenz (Roche) in die Vertiefungen zu 100µl frischen CGM pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Mikrotiterplatten für eine Minute auf einen Schüttler gestellt und dann die Absorption mittels eines ELISA-Readers bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm gemessen. Die Extinktionswerte der DBM-exponierten Zellen bzw. der mit dem Medium der DBM in Kontakt gekommenen Zellen wurden als Prozent von den Extinktionswerten der unbehandelten Chondrozyten ermittelt. Dafür wurden die Extinktionswerte der nicht-exponierten Chondrozyten als 100% angenommen.

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{Exponierte Chondrozyten}}{\text{Nicht-exponierte Chondrozyten}} \times 100$$

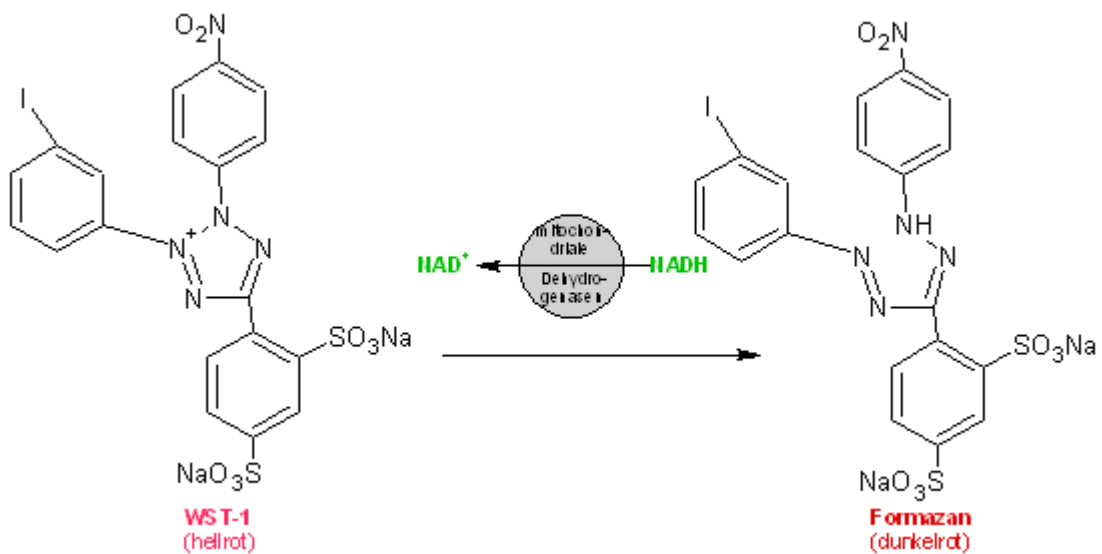


Abb. 12: Umwandlung von WST-1 zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen

2.4.3. Zellproliferationstest: BrdU-Test

Dieser Test bietet die Möglichkeit, die DNA-Synthese und die Zellproliferation der Zellen zu bestimmen. Das Prinzip beruht darauf, dass aktive Zellen 5-Brom-2-desoxy-Uridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA einbauen. Zellen, die BrdU in ihrer DNA inkorporiert haben, können durch Verwendung eines monoklonalen

Antikörpers gegen BrdU, der mit einem Enzym gekoppelt ist, schnell nachgewiesen werden.

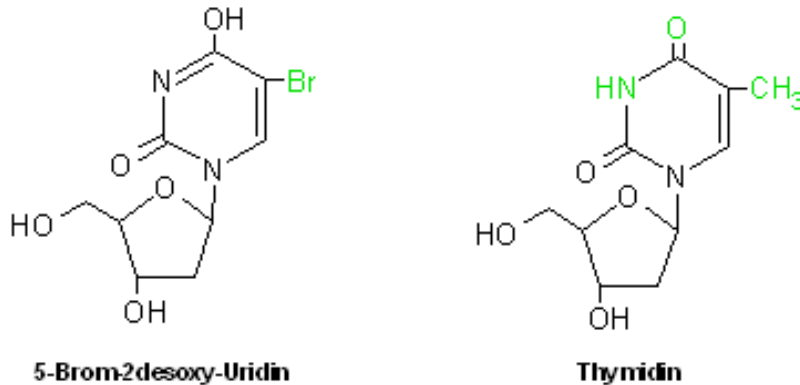


Abb. 13: Unterschiede in der Strukturformel zwischen BrdU und Thyminidin

Auch hier wurde zunächst die DBM entfernt. Verwendet wurde der BrdU-Cell-Proliferation-Assay der Firma Calbiochem. Gemäß Herstellerinformationen wurden 20µl BrdU-Lösung pro Vertiefung zu 100µl frischem Zellkulturmedium hinzugegeben und die Proben bei 37°C, 5% CO₂ ca. 16 Stunden inkubiert. Danach wurde die Lösung vollständig entfernt und 200µl Fixierungs- und Denaturierungslösung zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen dieser Lösung wurden 100µl Anti-BrdU-Arbeitslösung pro Vertiefung hinzugefügt und abermals bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde die Lösung abpipettiert und dreimal mit PBS-Waschlösung gewaschen. Nach Zugabe von 100µl Peroxidase-Goat-Anti-Mouse-IgG-HRP für 30 Minuten erfolgte abermals ein Waschschriff mit PBS. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit destilliertem Wasser gespült. Vom Substrat wurden je Vertiefung 100µl hinzugegeben und im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Stop-Lösung wurden die Extinktionen bei 450nm gemessen. Die Extinktionswerte der DBM-exponierten bzw. der mit dem Medium der DBM in Kontakt gekommenen Zellen wurden als Prozent von den Extinktionswerten der unbehandelten Chondrozyten ermittelt. Dafür wurden die Extinktionswerte der nicht-exponierten Chondrozyten als 100% angenommen.

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Exponierte Chondrozyten}}{\text{Nicht-Exponierte Chondrozyten}} \times 100$$

2.4.4. Vitalfärbungen: Lebend-Tot-Darstellung

Die Lebensfähigkeit der Chondrozyten, die mit bzw. ohne DBM und deren CGM inkubiert wurden, kann mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbungen ermittelt werden. Lebende und tote Chondrozyten werden hierbei unterschiedlich angefärbt, indem intakte und defekte Plasmamembranen unterschiedlich durchlässig für Farbstoffe sind. Das Fluoresceindiaceetat (FDA) ist nicht fluoreszierend. Es ist in der Lage, die intakte Zellmembran zu durchdringen, wird intrazellulär durch Esterasen zu Fluoreszein umgewandelt und fluoresziert grün. Als Tot-Färbung dient Propidiumiodid (PI), welches durch die defekte Plasmamembran in das Zellinnere gelangt und die DNA rot fluoreszierend anfärbt.

Färbelösung	Firma	Herstellung der Färbelösung	Gebrauchskonzentration
Fluoresceindiaceetat (FDA)	BioChemica	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 3mg FDA in 1ml Aceton lösen ➤ Verdünnung: 1:1000 in PBS 	3µg / ml
Propidiumiodid (PI)	Fluka	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 3mg PI in 3ml PBS lösen ➤ Verdünnung: 1:100 in PBS 	10µg / ml

Tab. 8: Herstellung der Färbelösungen für die Lebend-Tot-Färbungen

Zunächst wurde die DBM mit den Knorpelzellen nach 96 Stunden vorsichtig aus den Vertiefungen der 96-Wellplatten entfernt und in eine neue 96-Wellplatte gegeben, um die DBM mit den Zellen und die Zellen, die am Boden der Vertiefungen gewachsen waren, gesondert auswerten zu können. Die DBM mit den Zellen sowie die Vertiefungen mit den Knorpelzellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend wurde die fertige FDA-Lösung (siehe Tab. 8) hinzugegeben, bis die DBM und die Vertiefungen der 96-Wellplatten gut bedeckt waren. Die Inkubation von 15 Minuten erfolgte bei 37°C im Dunkeln. Danach folgte ein erneuter Waschgang mit PBS. Zur Darstellung der toten Zellen wurde nun für 1 Minute bei Raumtemperatur die PI-Lösung (siehe Tab. 8) hinzupipettiert. Nach einem dreimaligen Waschgang mit PBS á 10 Sekunden wurden die Proben mikroskopiert und photographiert. Alle Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeines

Ziel der Arbeit war es, die Eignung der humanen demineralisierten Knochenmatrix als Trägermaterial im Tissue Engineering von humanem Knorpelgewebe zu untersuchen.

In einem ersten Versuchsarm (Kap. 2.2.) wurde die DBM mit verschiedenen Konzentrationen humaner Chondrozyten besiedelt und die Morphologie, De- und Redifferenzierung und die Kollagensynthese der Knorpelzellen untersucht. Unter Berücksichtigung der publizierten Untersuchungen bezüglich möglicher toxischer Effekte der DBM und der erforderlichen Zelldichte, sollte bei Besiedlungsschwierigkeiten der DBM mit den Chondrozyten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Sollten diese Schwierigkeiten auftreten, stellten sich die Fragen, ob die DBM evtl. einen toxischen oder proliferationshemmenden Effekt auf die Knorpelzellen hat oder ob die Chondrozyten zur besseren Kultivierung auf der großporigen DBM vorher eine 3-D-Struktur benötigen, um Zell-Zell-Kontakte und eine extrazelluläre Matrix aufzubauen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden weitere Experimente durchgeführt. Dabei wurde in einem zweiten Versuchsteil (Kap. 2.3.) die in-vitro-Kultivierung von Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM untersucht.

Der dritte Versuchsteil (Kap. 2.4.) analysierte eine mögliche Proliferationshemmung bzw. sogar Zytotoxizität der DBM auf die Knorpelzellen und untersuchte die Proliferation der Chondrozyten in Abhängigkeit von der Konzentration der DBM und der Kultivierungsdauer mittels eines ELISA-Verfahrens mit zwei unabhängigen Testverfahren. Zur Visualisierung von lebenden und toten Zellen wurde im Anschluss eine Vitalfärbung durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Pro Versuchsteil wurden insgesamt sechs verschiedene Ansätze untersucht. Zur Veranschaulichung wird die kurze Beschreibung der einzelnen Ansätze hier nochmals aufgezeigt (siehe Tab. 9).

Ansatz	Beschreibung
1	Zellkulturmedium pur (= CGM; Negativkontrolle für gaschromatographische Analyse, Bestimmung des PES-Gehaltes und ELISA)
2	Chondrozyten (Kontrolle)
3	DBM (Negativkontrolle)
4	DBM + Chondrozyten
5	Chondrozyten + CGM von Ansatz 3
6	Chondrozyten + CGM von Ansatz 4

Tab. 9: Beschreibung der einzelnen Versuchsansätze; CGM = Zellkulturmedium

3.1.1. Chondrozytenisolierung und Vermehrung

Die Chondrozyten wurden aus hyalinem, nasoseptalem Knorpel isoliert und in Zellkulturflaschen vermehrt. Die Zellzahl hing im Wesentlichen von der Größe der Probe ab. Individuelle Faktoren wie Alter des Spenders bzw. Geschlecht zeigten in den eigenen Untersuchungen keinen erkennbaren Einfluss. Die Tabelle 10 stellt neben Alter und Geschlecht auch die Zellzahl nach Verdau des Knorpels dar.

Um jedoch trotzdem mögliche individuelle Unterschiede, wie Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen der Spender als Einfluss auf das Zellwachstum zu minimieren und eine ausreichend hohe Zellzahl für den Versuch verwenden zu können, wurden die Zellen der verschiedenen Spender gepoolt. Die Zellzahl betrug für die gepoolten Proben im ersten Versuchsaufbau (Kap. 2.2.) des Experimentes nach 2 Passagen 10,5 Millionen Zellen, im zweiten Versuchsteil (Kap. 2.3.) ca. 72 Millionen Zellen und im dritten Versuchsteil (Kap. 2.4.) ca. 19 Millionen Zellen. In allen Fällen betrug die Kultivierungszeit durchschnittlich 18 Tage (± 2 Tage). Wie oben beschrieben, wurden für den Teil I des Versuches 500 000, 1 Million und 5 Millionen Zellen, für den Teil II 12 Millionen Zellen pro Ansatz verwendet und für den Teil III 5000 Zellen pro Vertiefung der Mikrotiterplatten. Die nicht benötigten Zellen wurden für evtl. spätere Kontrollen eingefroren.

Versuchsteile	Nummer	Alter	Geschlecht	Zellzahl nach Verdau
TEIL I	1	47	M	4.698.000
	2	58	M	5.460.000
	3	24	W	340.000
TEIL II	4	49	M	3.780.000
	5	54	M	360.000
	6	30	W	1.230.000
	7	43	M	2.047.000
	8	46	M	1.400.000
	9	29	M	1.730.000
	10	32	M	1.980.000
	11	31	W	1.890.000
	12	45	M	90.000
	13	52	M	2.080.000
	14	25	W	1.340.000
TEIL III	15	50	M	1.340.000
	16	59	W	1.430.000
	17	36	W	1.840.000
	18	22	M	895.000
	19	52	M	1.120.000
	20	20	M	315.000
	21	36	M	1.600.000
Kontrolle	22	31	M	Nativer Knorpel (diente als Kontrolle)

Tab. 10: Aufstellung der verwendeten Knorpelproben nach dem Knorpelverdau nach Alter, Geschlecht und Zellzahl

3.1.2. Veränderung der Zellmorphologie in der Monolayerkultur

Im dreidimensionalen Gefüge des Knorpelgewebes liegen die Chondrozyten in einer rund-ovalen Form vor, in sog. Chondronen [20]. Nach dem Verdau und der Vermehrung der Chondrozyten in Monolayerkulturen verlieren die Chondrozyten ihr typisch rundes Aussehen und bilden spindelförmige Gestalten mit Zellausläufern, die an Fibroblasten erinnern. Dieser bereits schon beschriebene Vorgang wird als Dedifferenzierung bezeichnet [28] und konnte in der Anzucht der Knorpelzellen in den Monolayerkulturen lichtmikroskopisch beobachtet werden (Abb. 14).

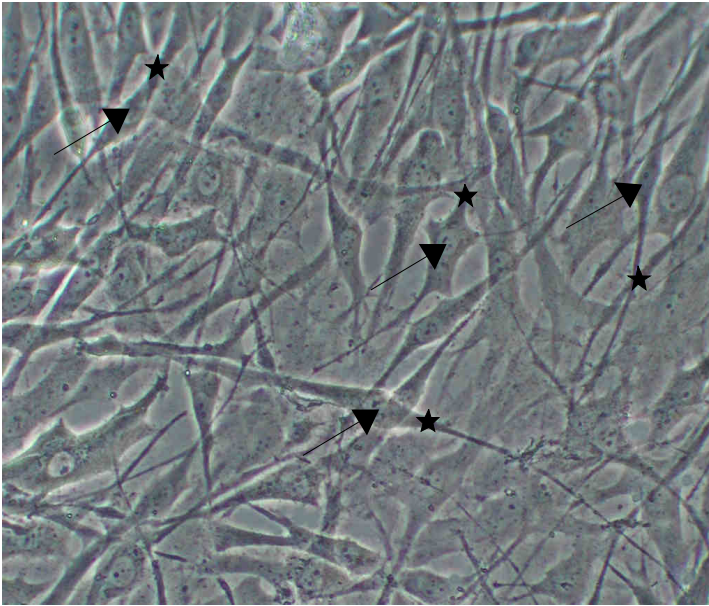


Abb. 14: Lichtmikroskopische Darstellung von Chondrozyten in der Monolayerkultur (Blick in eine Zellkulturflasche), Zellen (→) mit Zellausläufern (★)
Vergrößerung: 20fach

Deutlich erkennt man lang ausgestreckte Zellen (→), die über Fortsätze (★) miteinander in Verbindung zu stehen scheinen. Die Zellen haben ihre typisch runde Form verloren und erinnern an Fibroblasten. Das beim nativen Knorpel charakteristische Netz aus dichter Interterritorialsubstanz fehlt.

3.2. Teil I: Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten

Dieser Versuchsteil wurde mit drei verschiedenen Zellkonzentrationen durchgeführt, 500.000, 1 Million und 5 Millionen Zellen. Während der Kulturzeit von 28 Tagen waren die DBM-Würfel sehr gut mit Medium rehydriert und eine Veränderung in Form und Größe der DBM konnte nicht beobachtet werden. Unterschiede zwischen den Ansätzen mit 500.000, 1 Million oder 5 Millionen Zellen konnten weder makroskopisch, mikroskopisch noch in den Western-Blot-Analysen festgestellt werden. In den Abbildungen ist deshalb nur der Ansatz mit 1 Million Zellen dargestellt. Der histologische und immunhistochemische Nachweis der Fibroblasten in der DBM gelang nicht.

3.2.1. Histologie

Die histologische Auswertung zeigte ein sehr geringes Zellwachstum, denn sowohl in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) als auch in der Alcianblau-Färbung ließen sich nur wenige Zellen entlang der DBM darstellen (Abb. 15 A und B). In diesen beiden Abbildungen sind nur vereinzelt Zellkerne erkennbar (→). Die Zellen wirken langgestreckt und fibroblastenartig. Die bläuliche Färbung der extrazellulären Matrix in Abb. 15 B deutet auf die Bildung von kollagenen Fasern hin, doch die Zellformation zwischen der DBM scheint z.T. von Zelltrümmern durchsetzt zu sein.

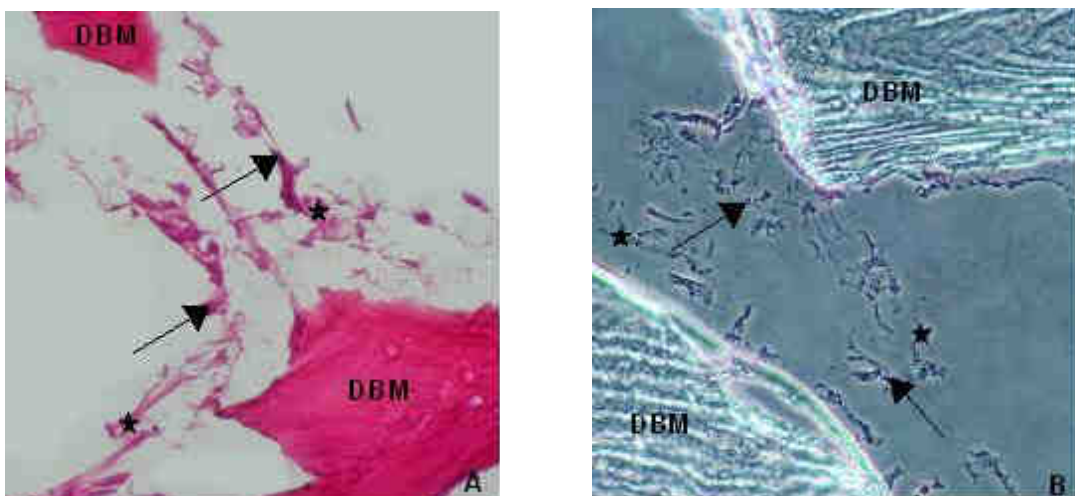


Abb. 15: HE-Färbung (A) und Alcianblau-Färbung (B), lang gestreckte Knorpelzellen (→) mit ausgedehnten Zellausläufern (★), Vergrößerung: 20fach

3.2.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen Kollagen I und II durchgeführt und dieser über einen sekundären Antikörper an einen roten Farbstoff gekoppelt. Wie bereits schon in der HE- und Alcianblau-Färbung, waren nur vereinzelt Zellen zu erkennen (Abbildung 16). Auch hier wirken die Zellen deformiert und apoptotisch (→). Die extrazelluläre Matrix (★) stellt sich in der Kollagen-I-Färbung (Abb. 16 A) deutlich rötlich dar. Dagegen ist in Abbildung 16 B (Kollagen- II-Färbung) die extrazelluläre Matrix (★) kaum rot angefärbt. Der überwiegende Teil der extrazellulären Matrix stellte sich hier bläulich dar (Abb. 16 B).

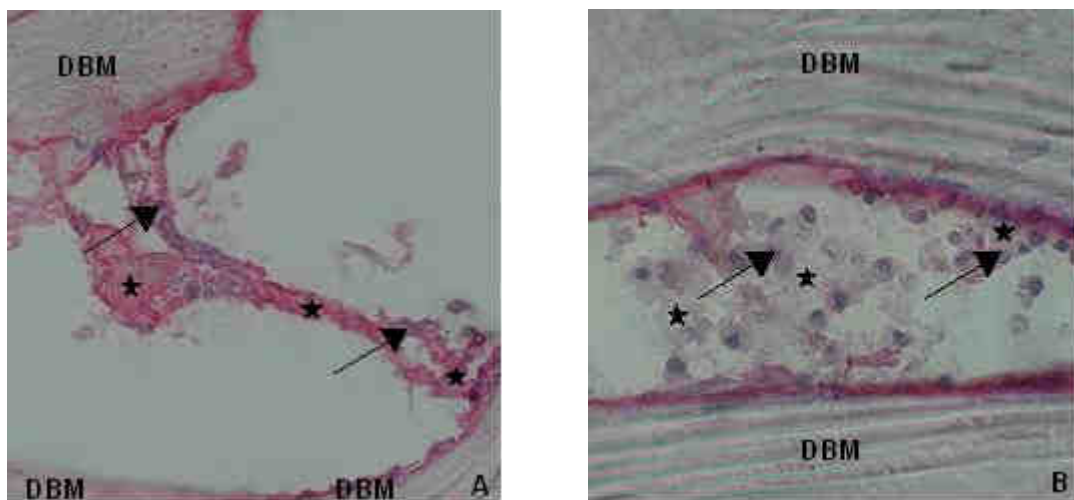


Abb. 16: Immunhistochemische Darstellung: Kollagen-I-Färbung (A) und Kollagen-II-Färbung (B); deformierte Zellen (→) in extrazellulärer Matrix (★)

3.2.3. Western-Blot-Analysen

Die Methode des Western Blot ermöglicht den Nachweis von wichtigen Proteinen der Chondrozyten. Untersucht wurde das Vorhandensein von Kollagen I und Kollagen II. Die bestimmten Proteinkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen lagen im Bereich der Nachweisgrenze. Die Proteinbanden für Kollagen I und II waren jedoch nicht verwertbar, da die Proteinkonzentrationen der einzelnen Ansätze zu gering waren. Auch in den Ansätzen mit humanen Fibroblasten konnten die Proteinbanden für Kollagen I nicht verwertet werden.

3.3. Teil II: In-vitro-Kultivierung von humanen Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM

Während der Kultivierung der Chondrozyten, der Formung der Makroaggregate und der Kultivierung mit der DBM konnten keine Auffälligkeiten hinsichtlich der Größe und Form der DBM, noch Farbveränderungen des Zellkulturmediums oder eine Verkeimung mit Bakterien oder Pilzen beobachtet werden. Auch zwischen den einzelnen Chondrozyten-makroaggraten der Ansätze 2, 4 und 5 konnte weder in dem Aussehen noch in der Größe makroskopisch Unterschiede festgestellt werden. Die DBM war während der gesamten Kultivierungszeit gut mit Zellkulturmedium (CGM) rehydriert.

3.3.1. Untersuchung des Peressigsäuregehaltes im Zellkulturmedium (CGM)

Zur Sterilisation und Herstellung eines antigenfreien, demineralisierten Knochens wird dieser u.a. mit Peressigsäure (PES) behandelt [63, 64]. Um Restbestände der PES in der DBM nachweisen zu können, wurde der Peressigsäuregehalt alle 2-3 Tage mit Peressigsäure-Teststreifen bestimmt. Als Negativkontrolle diente Ansatz 1, normales Zellkulturmedium, das weder mit Chondrozyten noch mit DBM in Kontakt kam und analog zu den anderen Ansätzen alle 2 Tage gewechselt wurde. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt konnte ein Farbumschlag der PES-Teststreifen der verschiedenen Ansätze von cremefarben ins bläuliche als Ausdruck von Peressigsäure im Medium beobachtet werden. Aufgrund der geringen Sensitivität der Teststreifen (Farbumschlag erst ab PES-Konzentrationen von $>0,5\text{mg/dl}$), kann lediglich festgestellt werden, dass die Konzentrationen der PES unterhalb der Nachweisgrenze der Teststreifen lagen und wenn PES aus dem DBM freigesetzt wurde, die Werte $<0,5\text{mg/dl}$ waren.

3.3.2. Gaschromatographische Analyse des Zellkulturmediums auf Chloroform

Die gaschromatographische Analyse der Medien wurde durch das Institut für Toxikologie durchgeführt.

Der gemessene Gehalt an Chloroform lag sowohl im Ansatz 3 (DBM ohne Zellen), als auch im Ansatz 4 (DBM mit Zellen) unter der Nachweisgrenze des Institutes von 2ng/ml und somit gab es für die Messwerte < 2ng/ml keine statistische Sicherheit. Vergleiche und Schlussfolgerungen waren folglich nicht möglich.

3.3.3. Histologische Auswertung

Da weder makroskopisch noch mikroskopisch Unterschiede zwischen den Ansätzen 5 und 6 beobachtet werden konnten, wurden in den folgenden Betrachtungen diese zusammen histologisch ausgewertet und jeweils nur die Abbildung des Ansatzes 5 (Chondrozyten-Makroaggregat + CGM von Ansatz 3) in dieser Arbeit aufgeführt.

3.3.3.1. HE – Färbung (Abbildungen 17-20)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde als Übersichtsfärbung verwendet. Zur Kontrolle wurde nativer Nasenseptumknorpel eines 31-jährigen Patienten nach korrigierender Rhinoplastik (siehe Tab. 10, Nr. 22) gefärbt.

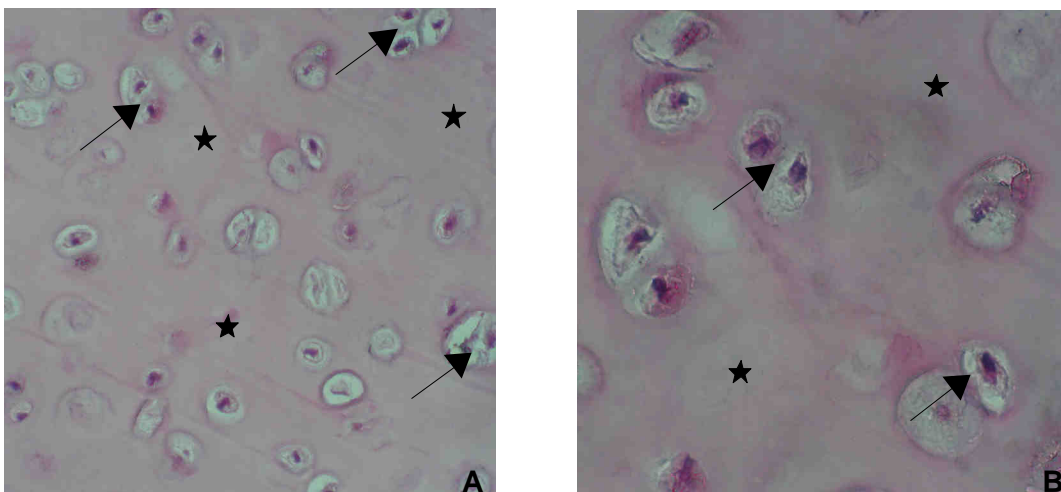


Abb.17: Kontrolle Nasenseptumknorpel in 20- (A) und 40facher (B) Vergrößerung Chondrozyten, die in Chondronen formiert sind (→) in interterritorialer Matrix (★); das Kollagen der Matrix stellt sich rot dar und die Zellkerne leicht bläulich; HE-Färbung

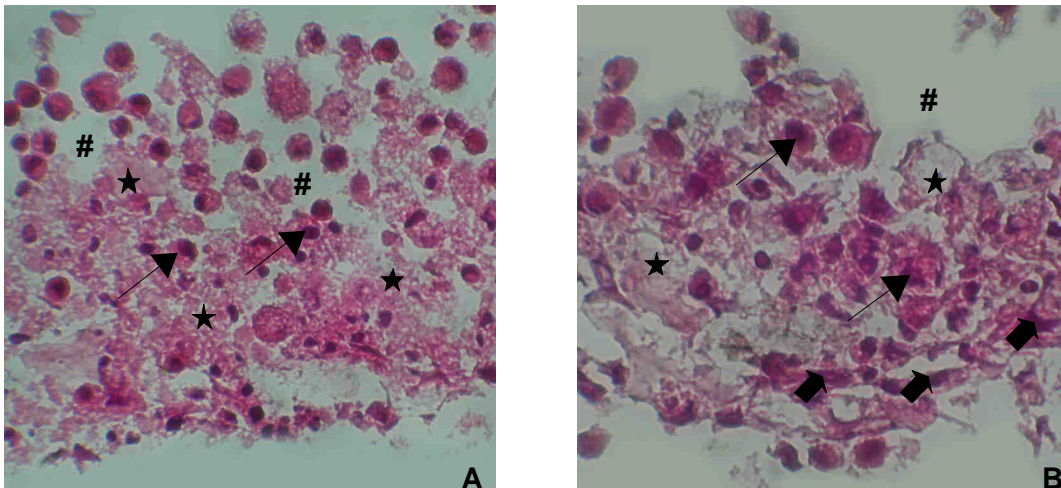


Abb.18: Makroaggregat Ansatz 2 (A) und Makroaggregat Ansatz 5 (B); Chondrozyten (→) umgeben von rötlicher extrazellulärer Matrix (★); vereinzelt Artefakte (#) durch Waschvorgänge; Vergrößerung: 40fach; HE-Färbung

In Abbildung 18 ist in Bild A ein Ausschnitt eines Makroaggregates des Ansatzes 2 dargestellt. In den rundlichen Knorpelzellen (→) sind bläulich gefärbte Zellkerne erkennbar und die Zellen sind von einem mehr oder weniger dichten Netz an extrazellulärer Matrix (★) umgeben. Im Gegensatz zu den Zellen in der Monolayerkultur in Abbildung 14 sind die Knorpelzellen nun wieder kugelförmig und stehen scheinbar nicht mehr durch längliche Fortsätze untereinander in Kontakt. Das Bild B zeigt einen Ausschnitt eines Makroaggregates des Ansatzes 5, das mit dem Medium von Ansatz 3 inkubiert wurde. Auch hier sind deutlich rundliche, z.T. unregelmäßig geformte Chondrozyten (→) mit bläulichen Zellkernen zu erkennen, die von extrazellulärer Matrix (★) umgeben sind. Zum Teil entsteht jedoch der Eindruck, dass im Gegensatz zum Bild A vereinzelt Zellen eine längliche Form haben und durch Fortsätze noch miteinander in Verbindung stehen (➔). Durch Wasch- und Spülvorgänge wurden die Zellen leicht auseinander gespült, so dass größere artifizielle Zwischenräume (#) entstanden.

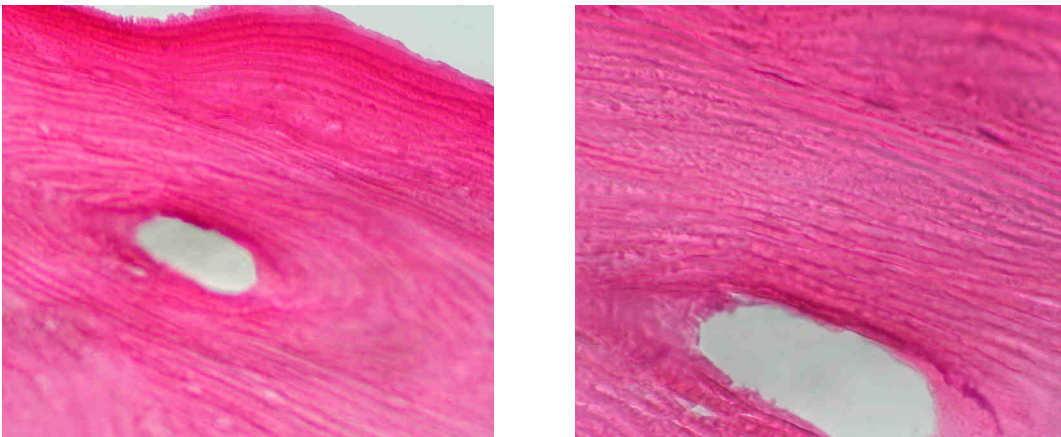


Abb.19: Demineralisierte Knochenmatrix in 20- (A) und 40facher (B) Vergrößerung; In der 40fachen Vergrößerung ist sehr gut die raue und lamelläre Oberflächenbeschaffenheit der DBM erkennbar. HE-Färbung

Zur Kontrolle wurde reine DBM (Ansatz 3), d.h. Knochenmatrix, die nicht mit Chondrozyten in Kontakt kam, mit HE gefärbt und in Abbildung 19 dargestellt. In der 40fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung ist die ausgeprägte grobe und unebene Oberflächenstruktur sehr gut sichtbar. Sowohl in der 20- als auch in der 40fachen Vergrößerung erkennt man, dass die DBM mit Poren durchzogen ist.

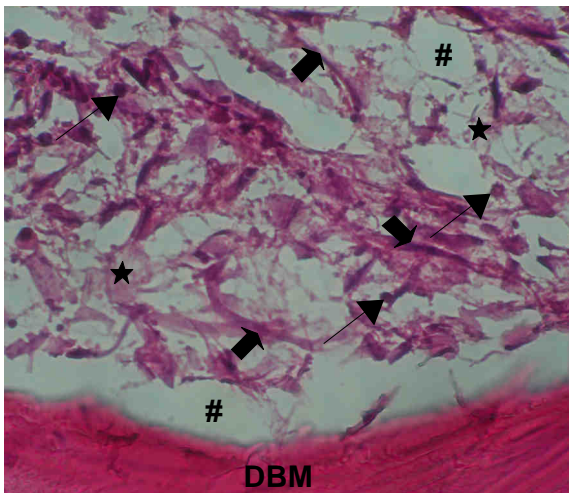


Abb. 20: DBM mit Chondrozyten-Makroaggregat besiedelt; Vereinzelt runde Zellen (→) und längliche Zellen (➤) in extrazellulärer Matrix (★) eingebettet; Artefakte (#) durch Wasch- und Spülvorgänge während des Färbeprozesses Vergrößerung: 40fach; HE-Färbung

Im Gegensatz zu den Makroaggregaten der Ansätze 2 und 5 (siehe Abb. 18) zeigt die Besiedlung des demineralisierten Knochens mit einem Chondrozyten-Makroaggregat (Ansatz 4, Abb. 20) nur vereinzelt runde Chondrozyten (→). Es dominieren dagegen längliche Zellen (➤), die über lang gezogene Fortsätze in

Verbindung stehen. Die rötliche Interterritorials substanz (★) ist weniger dicht als die in den Makroaggregaten (Abb. 18). Der Kontakt der Zellen mit der DBM ist durch Wasch- und Spülartefakte (#) während des Färbeprozesses nur noch minimal ersichtlich.

3.3.3.2. Alcianblau-Färbung (Abbildung 21-23)

Alcianblau ist geeignet, um selektiv sulfatierte Glykosaminoglykanen anzufärben, die Hinweis auf eine stattgefundene chondrogene Differenzierung sind. Diese werden leuchtend blau angefärbt. Zellkerne werden dagegen nicht blau koloriert und somit durch Kernechtrot gegengefärbt [87].

Zur Kontrolle wurde auch hier nativer Nasenseptumknorpel eines 31-jährigen Patienten (siehe Tab. 10, Nr. 22) gefärbt. Deutlich sichtbar ist die blaue Anfärbung der Glykosaminoglykane, die typischerweise besonders vermehrt in den Höfen um die Chondronen vorkommen (→). Die interzelluläre Matrix (★) dagegen ist schwächer bläulich angefärbt (Abb. 21).

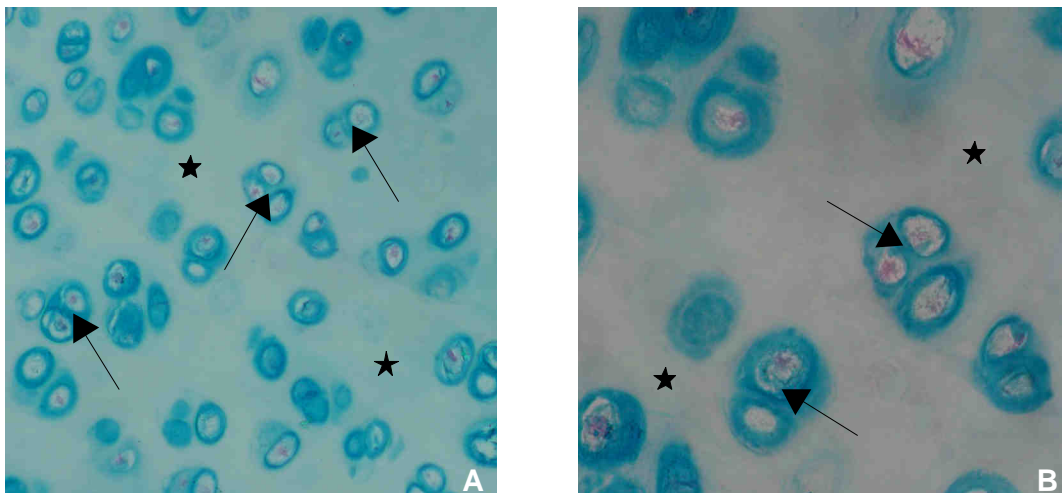


Abb. 21: Kontrolle Nasenseptumknorpel in 20- (A) und 40facher (B) Vergrößerung Chondrozyten, die in Chondronen formiert sind (→) in interterritorialer Matrix (★) Das Kollagen der Matrix stellt sich in dieser Färbung blau dar und Zellkerne leicht rötlich. Alcianblau-Färbung

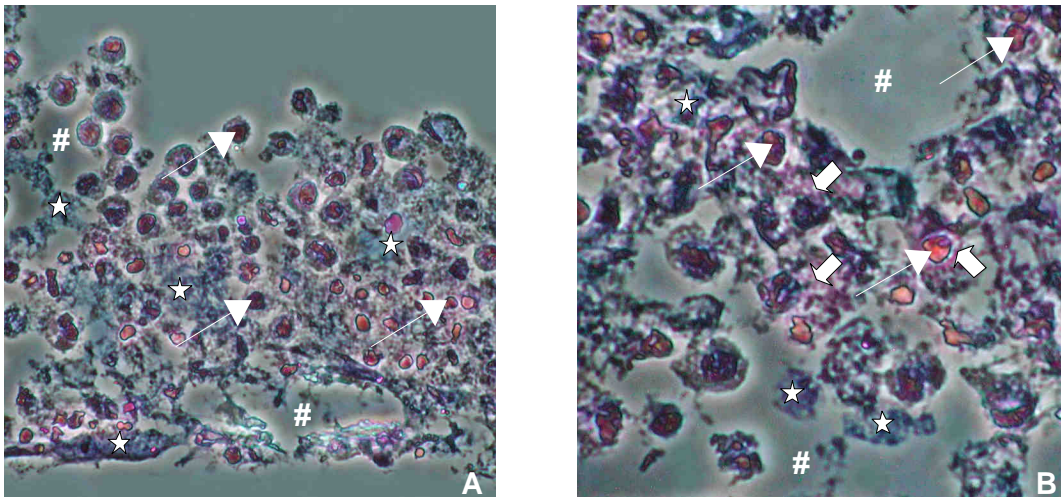


Abb. 22: Makroaggregat Ansatz 2 (A) und Makroaggregat Ansatz 5 (B); Chondrozyten (→) umgeben von bläulicher (★) und rötlicher extrazellulärer Matrix (⇨); vereinzelt Artefakte (#); Vergrößerung: 40fach; Alcianblau-Färbung

Die Abbildung 22, Bild A lässt rundliche, leicht rötliche Zellen (→), umgeben von schwach bläulich angefärbter Matrix (★) erkennen. Wie schon in der Abbildung 18 (HE-Färbung) scheinen die Zellen nicht mehr, wie in der Monolayerkultur, durch Fortsätze miteinander in Verbindung zu stehen. Die Interterritorialsubstanz (★) ist unterschiedlich stark mit Alcianblau angefärbt und dicht um die Chondrozyten formiert.

Der Ausschnitt eines Makroaggregates des Ansatzes 5 (mit CGM von DBM ohne Zellen inkubiert, Bild B, Abb. 22) zeigt ebenfalls rötlich gefärbte, rundliche, aber z.T. auch unregelmäßig geformte Knorpelzellen (→). Die extrazelluläre Matrix enthält im Vergleich zum Bild A hier jedoch mehr lila-rötlich, mit Kernechtrot gegengefärbte Areale (⇨) und weniger mit Alcianblau markierte Matrix (★). Die Matrix erscheint im Bild B weniger dicht und stärker durch die einzelnen Färbevorgänge aufgelockert (#).

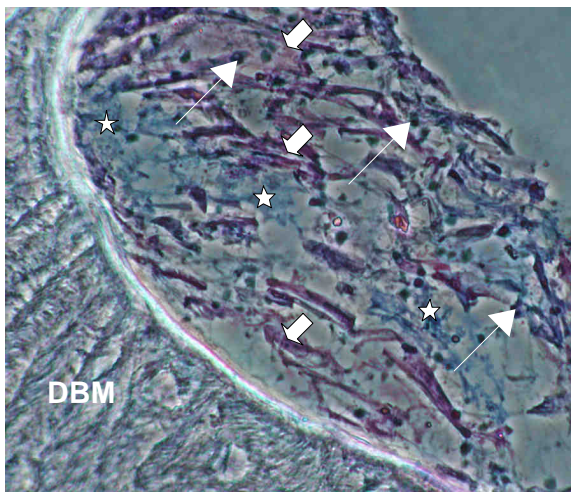


Abb. 23: DBM besiedelt mit Chondrozyten-Makroaggregat in 40facher Vergrößerung; Chondrozyten (→) mit lang ausgestreckten Zellausläufern in bläulicher (★) und rötlicher extrazellulärer Matrix (⇒) eingebettet Vergrößerung: 40fach; Alcianblau-Färbung

Die Besiedlung der demineralisierten Knochenmatrix mit Chondrozyten (→) wird in Abbildung 23 dargestellt. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Makroaggregaten fällt auch hier auf, dass die Zellen (→) eher länglich imponieren und mit ihren Ausläufern ein Netz aus interzellulärer Matrix spinnen (★,⇒). Diese Matrix ist zum größten Teil mit Kernechtrot rötlich gegengefärbt (⇒), während ein nur kleiner Anteil der Matrix hellblau koloriert ist (★). In dieser Abbildung erkennt man den Kontakt der Knorpelzellen mit der Oberfläche der DBM. Die Bildung von knorpeltypischen Chondronen konnte während der gesamten Kulturdauer in keiner der Färbungen beobachtet werden.

3.3.4. Immunhistochemie (IH)

Diese Auswertungsmethode ermöglicht die Visualisierung von spezifischen Gewebe- und Zellantigenen. In diesem Versuch wurden die Proben auf folgende Antigene untersucht:

- Kollagen II: der häufigste Kollagentyp im hyalinen Knorpel [20]
- Kollagen I: bei der Dedifferenzierung des Knorpels nachweisbar [20, 28]
- Caspase III: ein wichtiger Marker für die Apoptose [89-91]

Da weder makroskopisch noch mikroskopisch Unterschiede zwischen den Ansätzen 5 und 6 beobachtet werden konnten, wurden diese in den folgenden Betrachtungen zusammen immunhistochemisch ausgewertet und jeweils nur eine Abbildung aufgeführt (Ansatz 5).

3.3.4.1. Kollagen II (Abbildungen 24-26)

Kollagen II ist das typische fibrilläre Kollagen des Knorpels. Die Chondrozyten produzieren die weiträumige, extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen II besteht [20]. Der Nachweis von Kollagen II in den DBM-Chondrozyten-Konstrukten ist somit von zentraler Bedeutung, da das Wiederauftreten von Kollagen II ein spezifischer Marker für den Beginn der Redifferenzierung der Chondrozyten auf der demineralisierten Knochenmatrix ist.

Zur Kontrolle wurde auch in der immunhistochemischen Auswertung nativer, hyaliner Knorpel aus dem Nasenseptum angefärbt (siehe Abbildung 24). Die kollagene extrazelluläre Matrix (★) ist deutlich rötlich angefärbt und in den Chondrozyten (→) erkennt man in der 40fachen Vergrößerung lila-bläulich gegengefärbte Zellkerne.

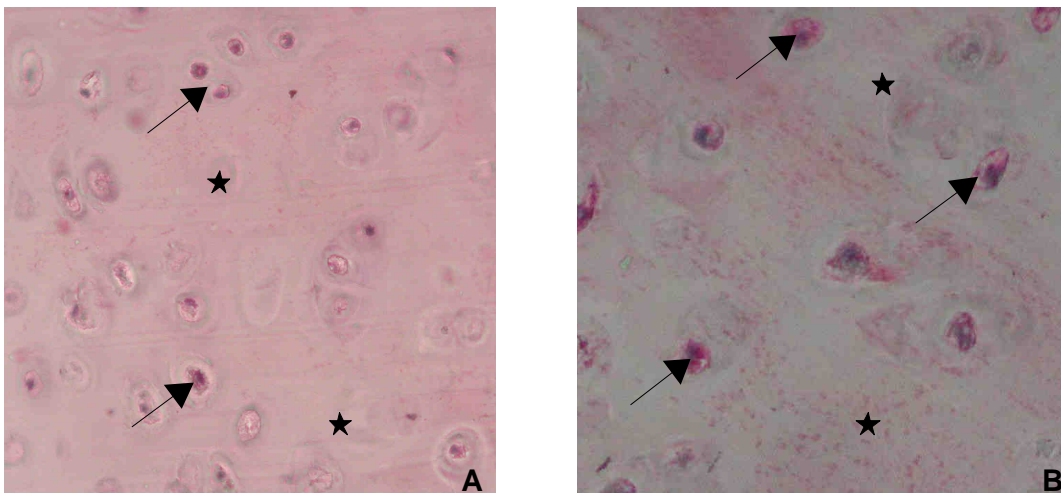


Abb. 24: Hyaliner Knorpel aus dem Nasenseptum in 20- (A) und 40facher (B) Vergrößerung; Chondrozyten (→) liegen in der deutlich rötlich gefärbten kollagenen Matrix (★); IH Kollagen II

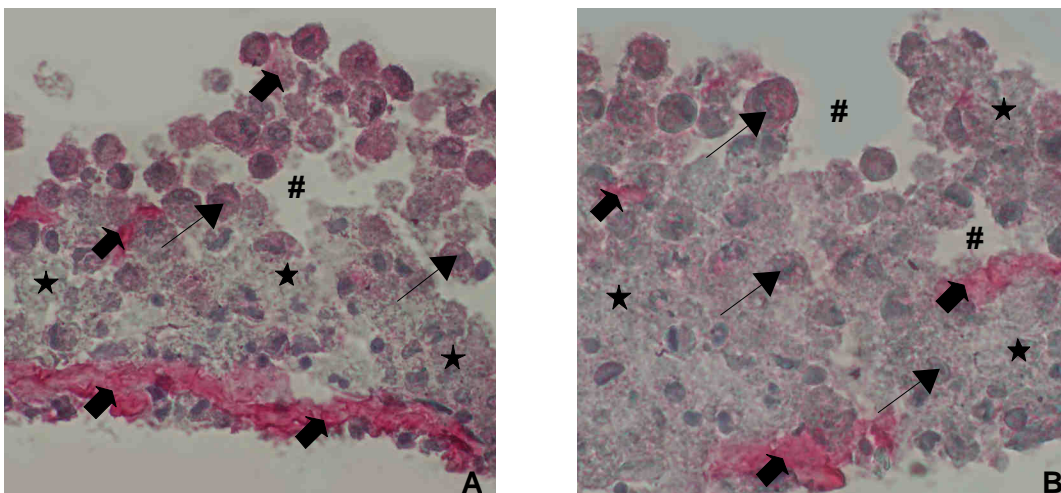
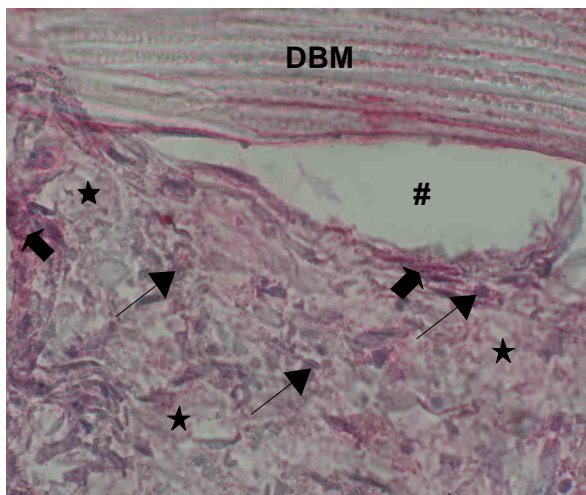


Abb. 25: Makroaggregat Ansatz 2 (A) und Makroaggregat Ansatz 5 (B); Chondrozyten (→) umgeben von dichter bläulicher extrazellulärer Matrix (★) und signifikant rötlicher Matrix (➡); vereinzelt Artefakte (#) durch Waschvorgänge; Vergrößerung: 40fach; IH Kollagen II

In der Abbildung 25, Bild A ist ein Ausschnitt aus dem Makroaggregat, das weder mit DBM noch mit deren Medium in Kontakt (Ansatz 2) gekommen ist, dargestellt. Kugelförmige Zellen (→) sind von einem dichten Netz extrazellulärer Matrix (★) umgeben. Diese erscheint leicht bläulich bis ins rötliche. Ein Teil der Matrix ist deutlich rot gefärbt (➡). Die Interzellularsubstanz (★) in B sieht dagegen weniger

rötlich aus und ist durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin bläulich gefärbt. Auch die Menge an rot gefärbter Matrix (➡) ist im Bild B auffallend geringer als in A. Wie bereits schon in der HE- und Alcianblau-Färbung beschrieben, sind die Zellen (Abb. 25, Bild A und B) eher rundlich und zeigen keine Zellausläufer mehr, über die die Zellen miteinander in Verbindung stehen.



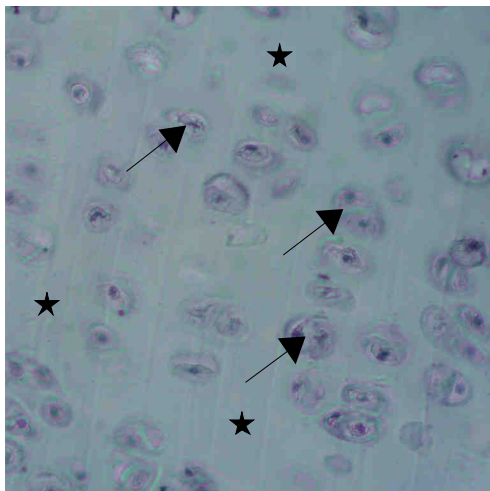
**Abb. 26: DBM mit Makroaggregat (Ansatz 4); Chondrozyten (→) umgeben von bläulicher (★) und rötlicher (➡) extrazellulärer Matrix; Artefakt (#) durch Waschvorgänge beim Färben
Vergrößerung: 40fach; IH Kollagen II**

In Abbildung 26 wird ein Ausschnitt der DBM mit einem Makroaggregat aus Chondrozyten (→) dargestellt. Die Zellen (→) zeigen noch eine längliche Form und haben z.T. ausgestreckte Zellausläufer, mit denen sie untereinander in Verbindung stehen. Die sehr dichte Interzellulärschubstanz zeigt vereinzelt noch mit Hämatoxylin gegengefärbte leicht bläuliche Areale (★), aber auch rötliche mit Fast Red gefärbte Areale (➡). Auch in dieser Darstellung wird der Kontakt der Zellen mit der DBM-Oberfläche sehr gut deutlich. Waschvorgänge haben zur teilweisen Ablösung (#) des Zellkomplexes von der DBM geführt.

3.3.4.2. Kollagen I (Abbildungen 27-29)

Um eine Dedifferenzierung und damit auch persistierende Kollagen-I-Produktion nachweisen zu können, wurden in der immunhistochemischen Färbung Antikörper gegen Kollagen I verwendet.

Als Negativkontrolle wurde auch in dieser immunhistochemischen Färbung nativer Knorpel aus dem Nasenseptum immunhistochemisch gefärbt. Die Abbildung 27 zeigt wie erwartet ein Fehlen von Kollagen I, denn Kollagen I kommt im nativen Knorpelgewebe nicht vor [20]. Lediglich wurde das native Knorpelgewebe mit Hämatoxylin blau gefärbt.



**Abb. 27: Hyaliner Knorpel aus dem Nasenseptum; Chondrozyten (→) eingebettet in blauer extrazellulärer Matrix (★)
Vergrößerung: 20fach; IH Kollagen I**

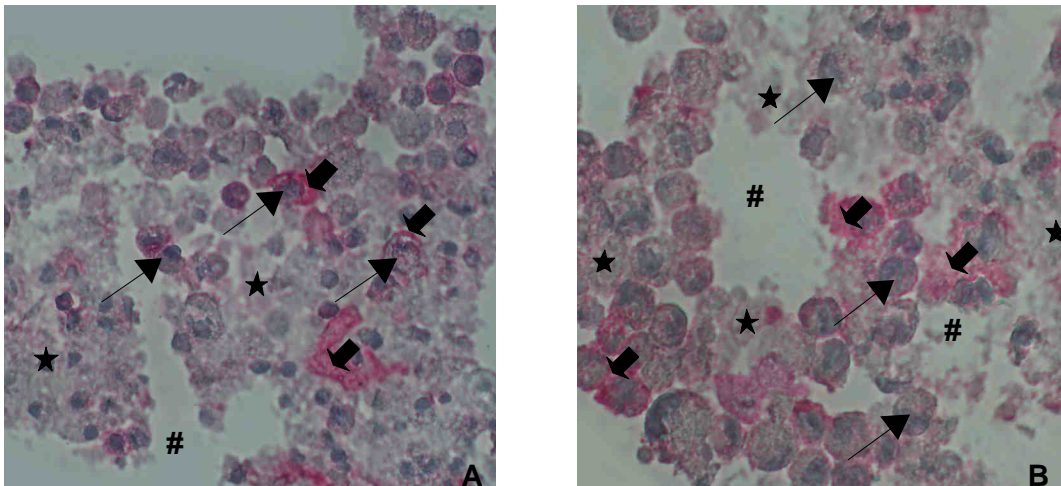


Abb. 28: Makroaggregat Ansatz 2 (A) und Makroaggregat Ansatz 5 (B); Chondrozyten (→) umgeben von bläulicher extrazellulärer Matrix (★) und z.T. rötlicher Matrix (➡); vereinzelt Artefakte (#) durch Waschvorgänge; Vergrößerung: 40fach; IH Kollagen I

Das Makroaggregat des Ansatzes 2 (Abb. 28, Bild A) zeigt viele rundliche Zellen (→) in zum größten Teil bläulicher gegengefärbter, extrazellulärer Matrix (★). Nur vereinzelt ist die Interterritorialsubstanz rot angefärbt (➡). Wie auch in den vorherigen Bildern sind lang gestreckte Zellen nicht mehr zu erkennen. Das Makroaggregat des Ansatzes 5 wird in Abbildung 28 B gezeigt. Die unregelmäßig geformten, ebenfalls hauptsächlich rundlichen Zellen (→) liegen in vorwiegend bläulicher extrazellulärer Matrix (★). Dennoch sind mehr immunhistochemisch rotgefärbte Areale (➡) als in Bild A (Abb. 28) erkennbar. Die interterritoriale Matrix ist in beiden Darstellungen durch die Färbeschritte aufgelockert (#).

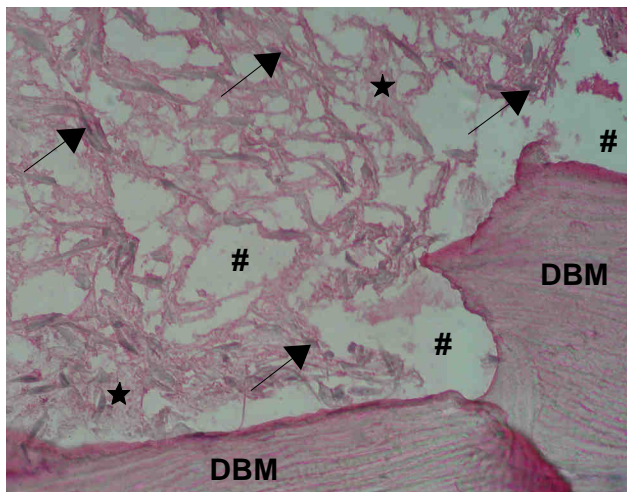


Abb. 29: DBM mit Makroaggregat (Ansatz 4) in 40facher Vergrößerung; Lang gestreckte Zellen (→) in rötlicher extrazellulärer Matrix (★), diese ist durch Färbeporgänge stark aufgelockert; IH Kollagen I

Abbildung 29 zeigt die Kollagen-I-Färbung der DBM, die mit einem Makroaggregat aus Chondrozyten besiedelt wurde. Die Zellen (→) zeigen hier eine längliche Form mit Zellfortsätzen. Die extrazelluläre Matrix (★) wurde deutlich immunhistochemisch rot koloriert. Bläuliche extrazelluläre Abschnitte sind nur zu erahnen. Der Zellverband wurde durch die einzelnen Färbeschritte z.T. auseinander getrieben (#).

3.3.4.3. Caspase III (Abbildungen 30-32)

Zum Nachweis von Apoptose, die u.a. durch toxische Substanzen, UV-Strahlen, Infektionen und den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann, werden die Schnitte mit Antikörpern gegen die Effektor-Caspase III untersucht. Um einen möglichen Zelltod der Chondrozyten während der Kultivierung auf der DBM aufzeigen zu können, wurde immunhistochemisch Caspase III angefärbt.

Als Positivkontrolle wurde natives Nasenseptum für 15 Minuten mit einer UV-Lampe bestrahlt und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C fixiert, eingefroren, geschnitten und immunhistochemisch ausgewertet. Dabei färbten sich Caspase-III-positive Chondrozyten rot an (Abb. 30).

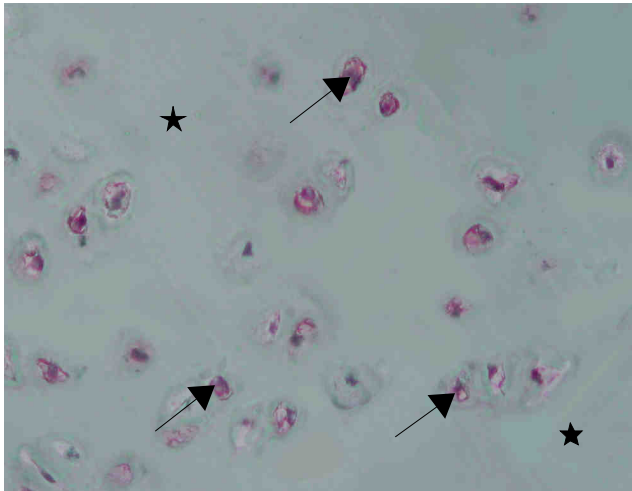


Abb. 30: Nasenseptumknorpel nach 15-minütiger Bestrahlung mit einer UV-Lampe; Deutlich rot gefärbte Chondrozyten umgeben von bläulicher Matrix (★)
Vergrößerung: 20fach; IH Caspase III

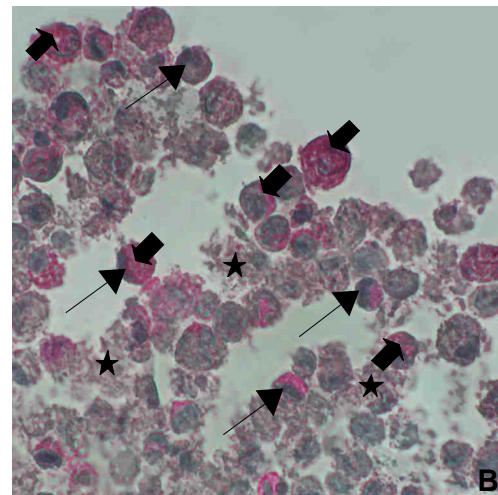
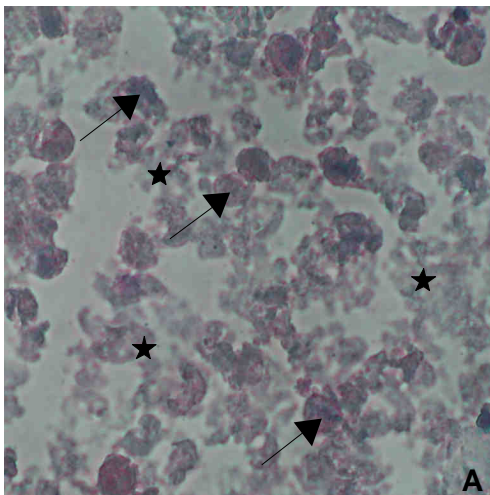


Abb. 31: Makroaggregat Ansatz 2 (A) und Makroaggregat Ansatz 5 (B); Chondrozyten (→) umgeben von bläulicher extrazellulärer Matrix (★) in Bild A und Zellen (→) z.T. kreisförmig von einem rötlichen Saum (➡) umringt (B); Vergrößerung: 40fach; IH Caspase III

In der immunhistochemischen Färbung (Abb. 31) wird in dem Bild A ein Ausschnitt aus einem Makroaggregat (Ansatz 2) dargestellt. Die kugeligen Zellen (→) sind in schwach bläulich angefärbte Matrix (★) eingebettet. Eindeutig rote Areale, die durch Fast Red angefärbt wurden, sind nicht sichtbar. Bild B zeigt dagegen ein Makroaggregat, das mit Medium von Ansatz 3 (DBM ohne Zellen) in Kontakt gekommen ist. Neben bläulicher interzellulärer Matrix (★) umgeben auch rötlich markierte Areale (➡) die Chondrozyten (→).

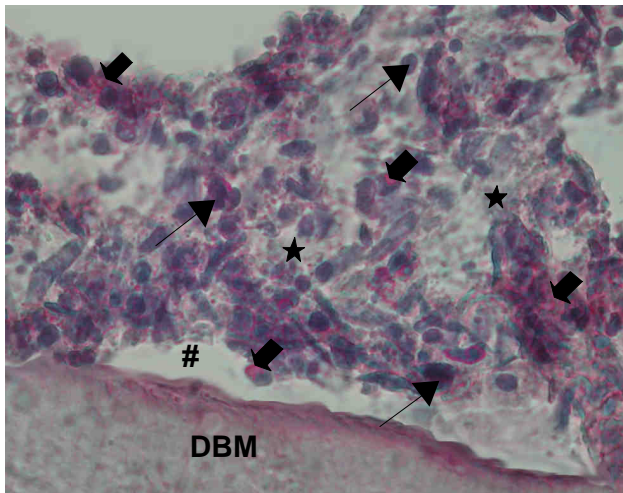


Abb. 32: DBM mit Makroaggregat (Ansatz 4) in 40facher Vergrößerung; Knorpelzellen (→) in bläulicher extrazellulärer Matrix (★) und rötlich angefärbte Areale (↗); Artefakte (#) durch Färbeporgänge IH Caspase III

Die Abbildung 32, die demineralisierte Knochenmatrix mit Chondrozyten darstellt, zeigt blaue, längliche bis ovale Zellen (→), die vereinzelt von rötlichen, Fast Red markierten Arealen umgeben sind (↗). Der überwiegende Teil der extrazellulären Matrix (→) ist jedoch mit Hämatoxylin bläulich gegengefärbt.

3.4. Teil III: Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen

In diesem Teil des Experimentes wurde die Auswirkung der demineralisierten Knochenmatrix auf die Vitalität und die Proliferation der Knorpelzellen mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens untersucht. Um dosisabhängige Effekte zu berücksichtigen, wurden fünf verschiedene Konzentrationen der DBM verwendet. Zur Analyse der Chondrozyten-Proliferation wurden mittels WST-1- und BrdU-Test zwei auf unterschiedlichen Prinzipien beruhende Testverfahren ausgesucht. Die Messungen fanden nach 24, 48 und 96 Stunden statt. In den folgenden Diagrammen wurde die Vitalität in Prozent ermittelt, indem die Extinktionswerte der Kontrollzellen (d.h. Chondrozyten, die weder mit DBM noch mit deren CGM in Kontakt gekommen sind) gleich 100% gesetzt und die Werte der anderen Ansätze als Prozent von der Kontrolle berechnet wurden. Nach 96 Stunden wurden von den Chondrozyten und der DBM mit den Zellen aus einem parallelen Versuchsansatz Vitalfärbungen durchgeführt.

Aufgrund der zu geringen Stichprobe ist eine statistische Auswertung nicht möglich. Durch die Verwendung von zwei unabhängigen Testverfahren können dennoch eingeschränkte Aussagen über die Tendenz der Vitalität und Proliferation der einzelnen Ansätze gemacht werden.

3.4.1. Zellproliferationstests: WST-1- und BrdU-Test

A) Chondrozyten + DBM

In diesem Ansatz wurden die Chondrozyten mit fünf verschiedenen DBM-Konzentrationen (10, 20, 50, 100 und 150mg) inkubiert und nach 24, 48 und 96 Stunden die Proliferationstests durchgeführt. Die Vitalität der Kontrolle wurde zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen mit in den Diagrammen dargestellt.

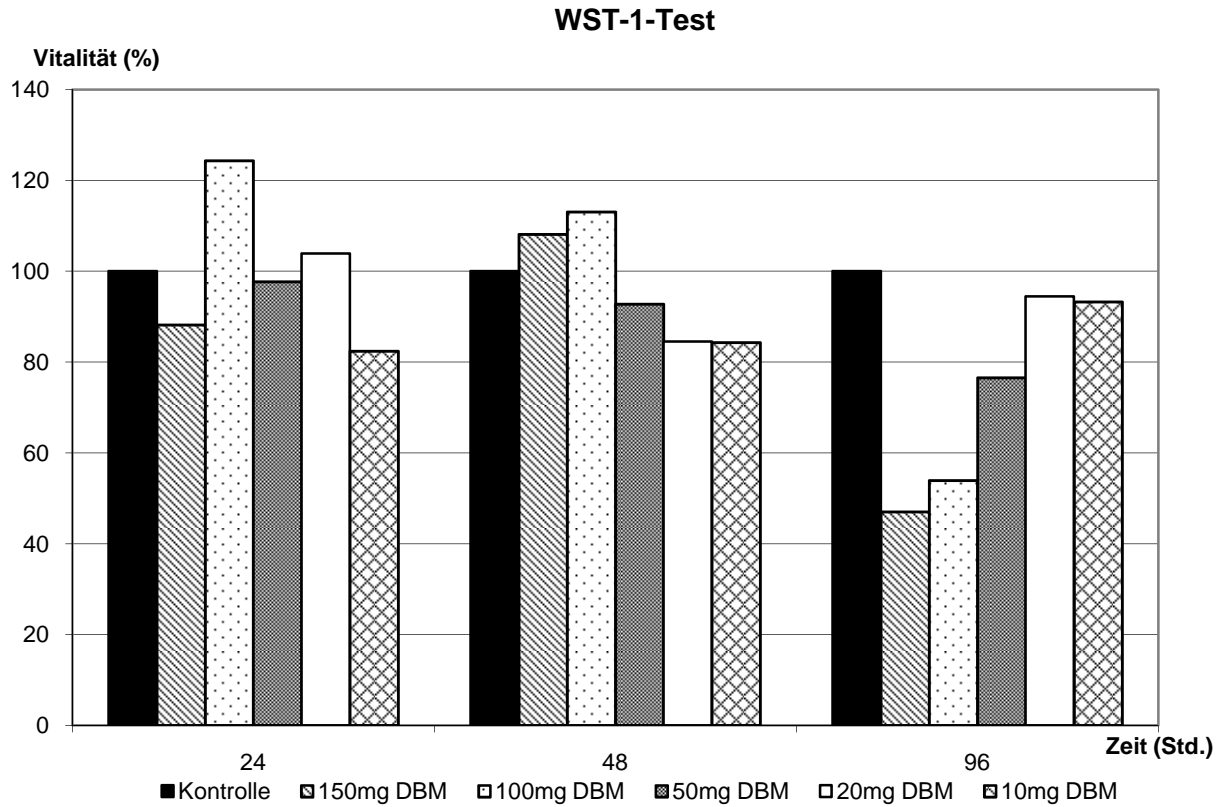


Diagramm 1: WST-1-Test: DBM in verschiedenen Konzentrationen + Chondrozyten

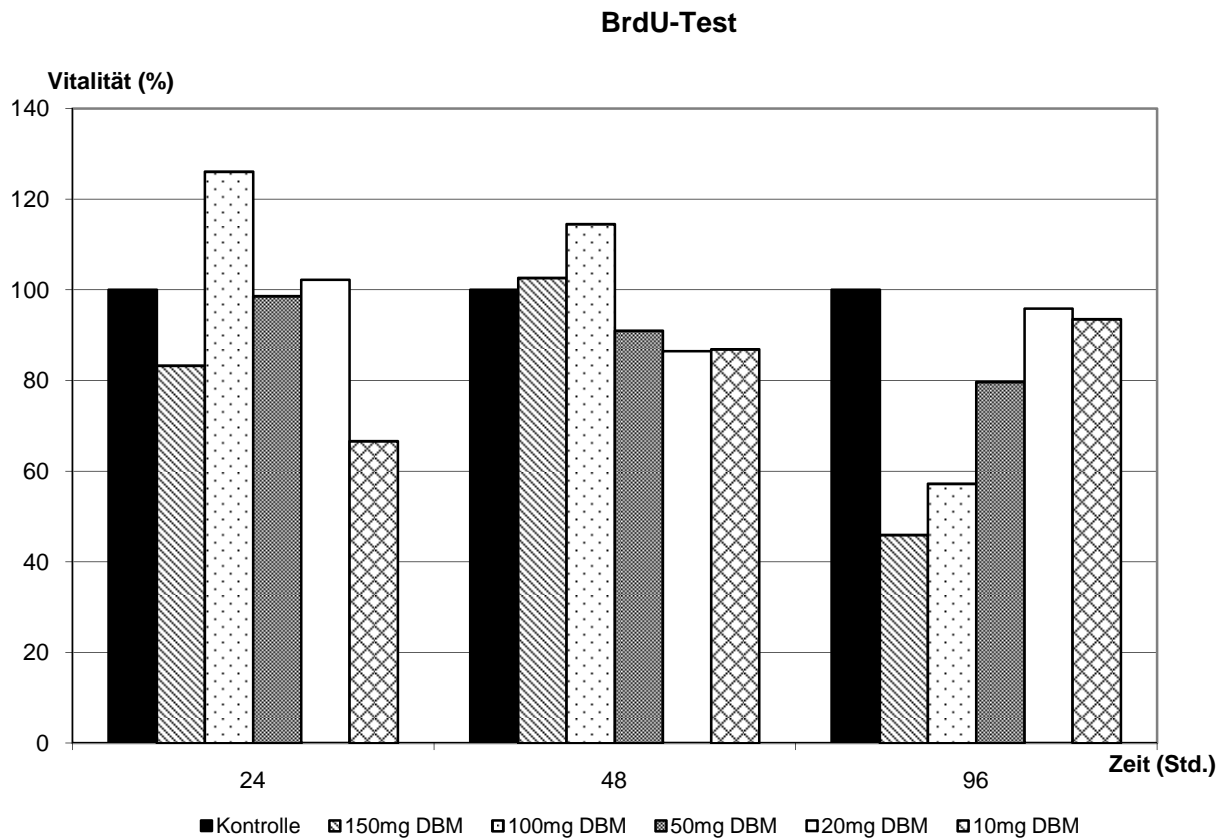


Diagramm 2: BrdU-Test: DBM in verschiedenen Konzentrationen + Chondrozyten

Auffallend war die sehr ähnliche Entwicklung der Vitalität in Bezug auf die Kontrolle in den beiden Testverfahren und der ähnliche Zeitverlauf über 24, 48 und 96 Stunden.

In den ersten 48 Stunden schienen höhere Konzentrationen an DBM ohne wesentlichen Einfluss auf die Vitalität der Chondrozyten zu sein, evtl. deutete sich sogar ein Trend zu einem initialen positiven Effekt an (Diagramm 1 und 2). Trotz dieser zunächst tendenziell höheren Vitalität einiger Ansätze mit DBM (100mg und 150mg DBM, 48 Std.) kam es im Zeitverlauf nach 96 Stunden zu einer deutlichen Reduktion. Sowohl im BrdU- als auch im WST-1-Test (Diagramm 1 und 2) fand sich eine dosisabhängige Proliferationshemmung der Chondrozyten durch die DBM. Je geringer die Dosierung der DBM war, desto weniger schien die Proliferation der Chondrozyten beeinträchtigt gewesen zu sein und desto weniger stark sank die Vitalität unter die der Kontrollgruppe.

B) Chondrozyten + Zellkulturmedium von Ansatz 3 (DBM ohne Zellen)

Um einen Einfluss von möglicherweise aus der DBM ins Medium freigesetzten proliferationshemmenden oder toxischen Substanzen auf die Knorpelzellen zu untersuchen und einen Einfluss der 3-D-Struktur des DBM auf die Zellen ausschließen zu können, erhielten Chondrozyten das Medium von Ansatz 3. Auch hier wurden fünf verschiedene Konzentrationen von der demineralisierten Knochenmatrix verwendet. Analog zu den anderen Ansätzen wurden nach 24, 48 und 96 Stunden der WST-1- und der BrdU-Test durchgeführt und die Vitalität der Zellen in Bezug auf die Kontrollzellen ermittelt und graphisch aufgetragen.

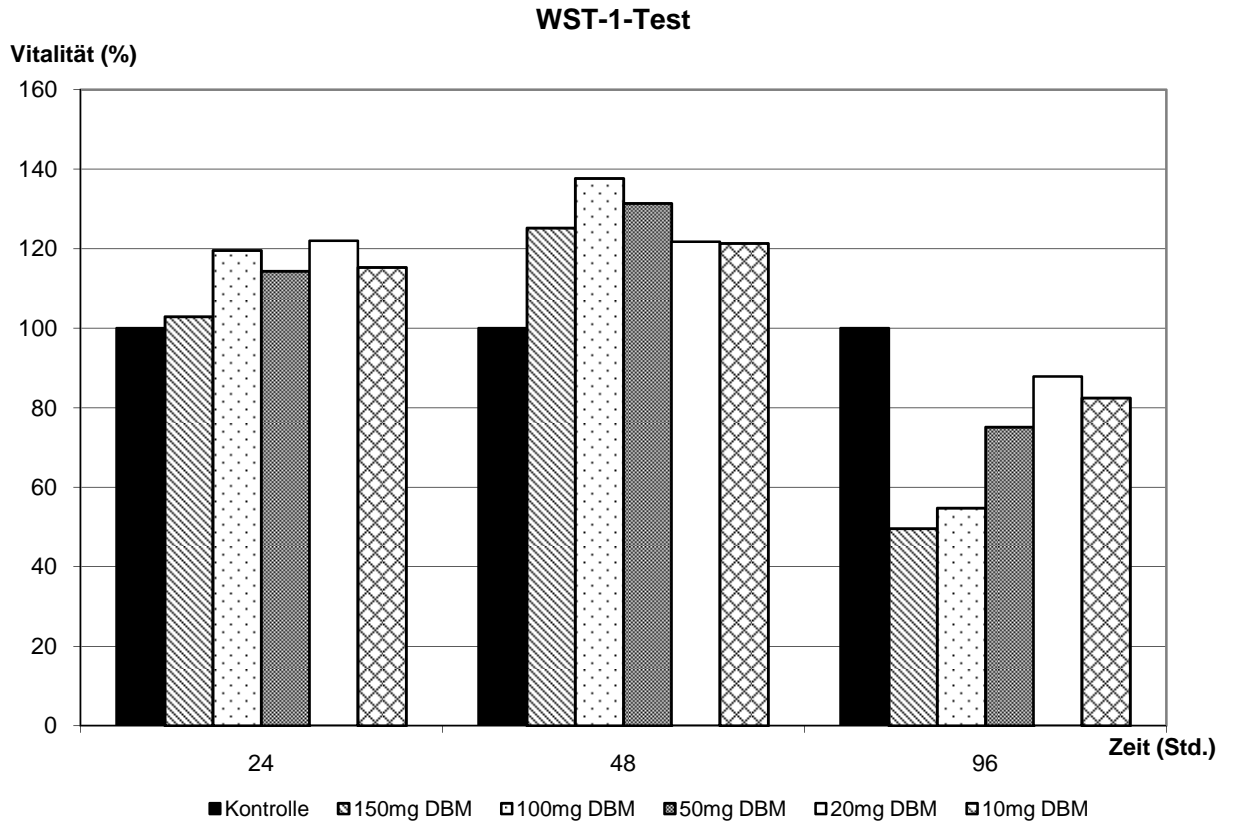


Diagramm 3: WST-1-Test: Chondrozyten + CGM von Ansatz 3 (DBM ohne Zellen)

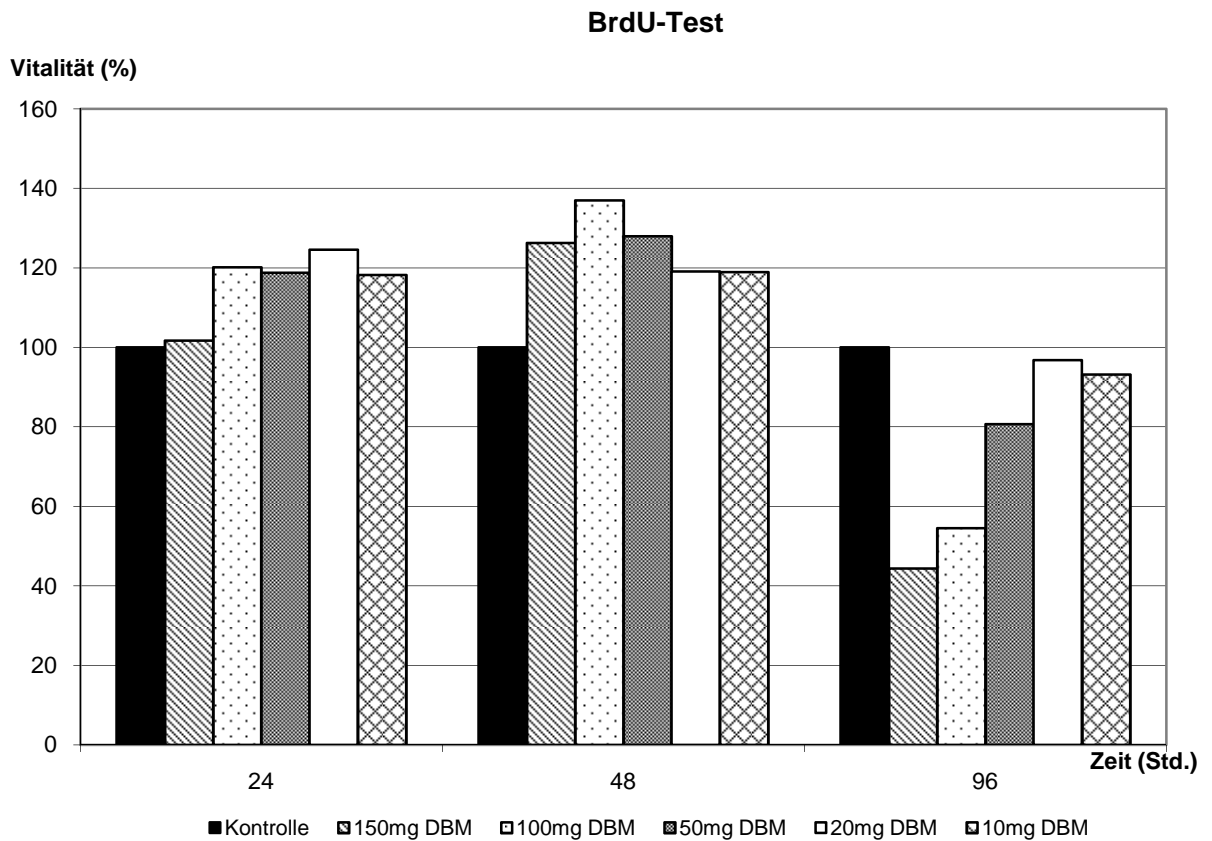


Diagramm 4: BrdU-Test: Chondrozyten + CGM von Ansatz 3 (DBM ohne Zellen)

Die Diagramme 3 und 4 zeigen nach 24 und 48 Stunden für die Chondrozyten, die mit CGM von Ansatz 3 inkubiert wurden, einen Trend zu einer höheren Vitalität als die Chondrozyten, die direkt mit den verschiedenen Konzentrationen von DBM inkubiert wurden (siehe Diagramme 1 und 2). Unterschiede in Abhängigkeit von der DBM-Konzentration fanden sich erst nach 48 Stunden. Nach 96 Stunden kam es zu einem dosisabhängigen, z.T. drastischen Abfall der Vitalität bei den Ansätzen mit 100 und 150mg DBM sogar um mehr als die Hälfte. Wie schon im vorherigen Versuchsansatz (siehe Diagramme 1 und 2) hatten geringere Konzentrationen von DBM auch einen geringeren Effekt auf die Proliferationsraten und damit die Vitalität. Bei 10-20mg DBM war bereits kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle mehr nachweisbar.

C) Chondrozyten + Zellkulturmedium von Ansatz 4 (DBM + Zellen)

Der Kontakt der Knorpelzellen mit der demineralisierten Knochenmatrix könnte das Herauslösen von proliferationshemmenden oder toxischen Stoffen und deren Freisetzung ins Medium zur Folge haben. Um dies als mögliche Ursache für Proliferationsstillstand und Zelltod genauer verifizieren zu können, wurde das Zellkulturmedium von Ansatz 4 (fünf verschiedene Konzentrationen von DBM + Knorpelzellen) zu den Zellen hinzupipettiert. Die Durchführung und Auswertung erfolgte analog zu den vorherigen Versuchsansätzen.

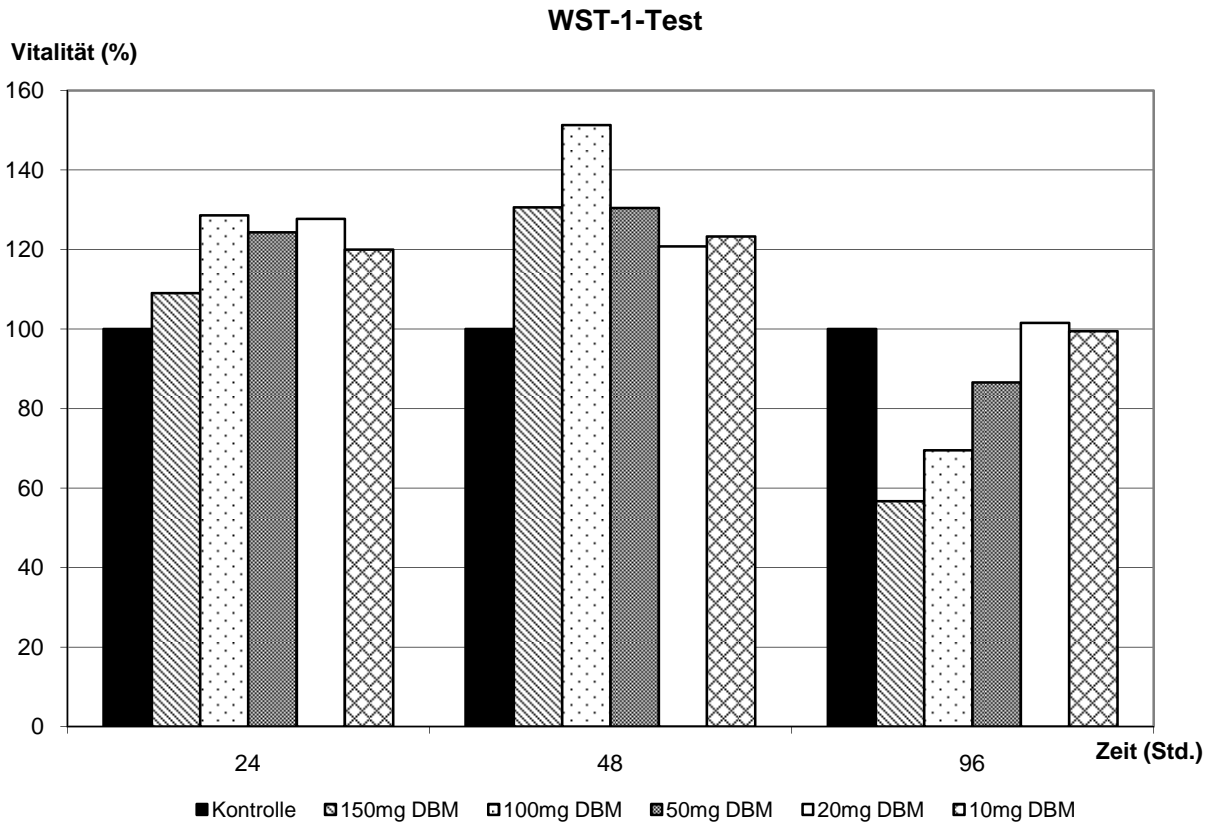


Diagramm 5: WST-1-Test: Chondrozyten + CGM von Ansatz 4 (DBM + Zellen)

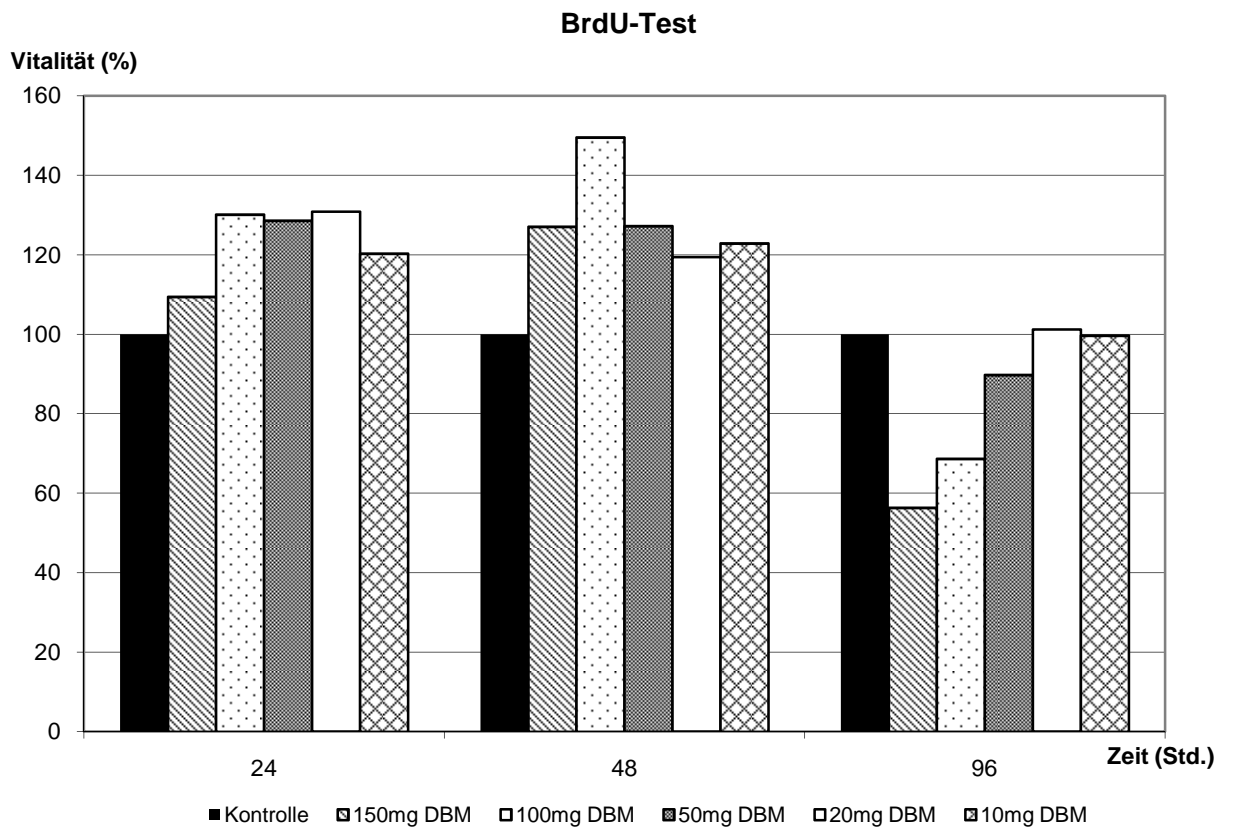


Diagramm 6: BrdU-Test: Chondrozyten + CGM von Ansatz 4 (DBM + Zellen)

Im Gegensatz zum direkt auf DBM kultivierten Knorpel (Diagramme 1 und 2), zeigten die Chondrozyten, die zusätzlich das Medium von Ansatz 4 erhielten, im WST-1- und BrdU-Test (Diagramme 5 und 6) in den ersten 48 Stunden tendenziell höhere Proliferationswerte. Vergleichbar mit den Chondrozyten nach Inkubation mit CGM von Ansatz 3 (Diagramme 3 und 4), fand sich weder in der zeitlichen Dynamik zwischen 24 und 48 Stunden noch zwischen den verschiedenen DBM-Konzentrationen ein deutlicher Unterschied.

Wie schon in den anderen Ansätzen (Diagramme 1-4) fiel nach 96 Stunden auch hier die Proliferationsrate dosisabhängig deutlich ab. Erneut führte Medium mit höheren Konzentrationen an DBM (50-150mg DBM) zum größten Abfall der Vitalität.

3.4.2. Vitalfärbungen: Lebend-Tot-Darstellung

Die Lebensfähigkeit der Chondrozyten mit bzw. ohne DBM kann mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbungen ermittelt werden. Lebende und tote Chondrozyten werden hierbei unterschiedlich angefärbt, indem intakte und defekte Plasmamembranen unterschiedlich durchlässig für Farbstoffe sind. Zur Durchführung der Vitalfärbungen wurde die DBM nach 96 Stunden entnommen und sowohl mit der Lebend- (FDA), als auch mit der Tot- (PI) Färbung angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Eine Vitalfärbung nach 24 und 48 Stunden wurde nicht durchgeführt, da davon auszugehen war, dass in dieser kurzen Zeit nicht ausreichend viele Zellen in die DBM eingewachsen waren.

Interessanterweise war es nach 96 Stunden nicht möglich, Chondrozyten, weder lebend noch tot, in der DBM nachzuweisen. Somit war nur eine Lebend-Tot-Darstellung der an den Boden der Mikrotiterplatten angewachsenen Zellen möglich, die mit den unterschiedlichen Konzentrationen der DBM über 96 Stunden kultiviert wurden. In allen Ansätzen (siehe Abb. 33) zeigten sich an den Boden angewachsene lang gestreckte Zellen (→), die über ausgedehnte Fortsätze (★) miteinander in Kontakt stehen.

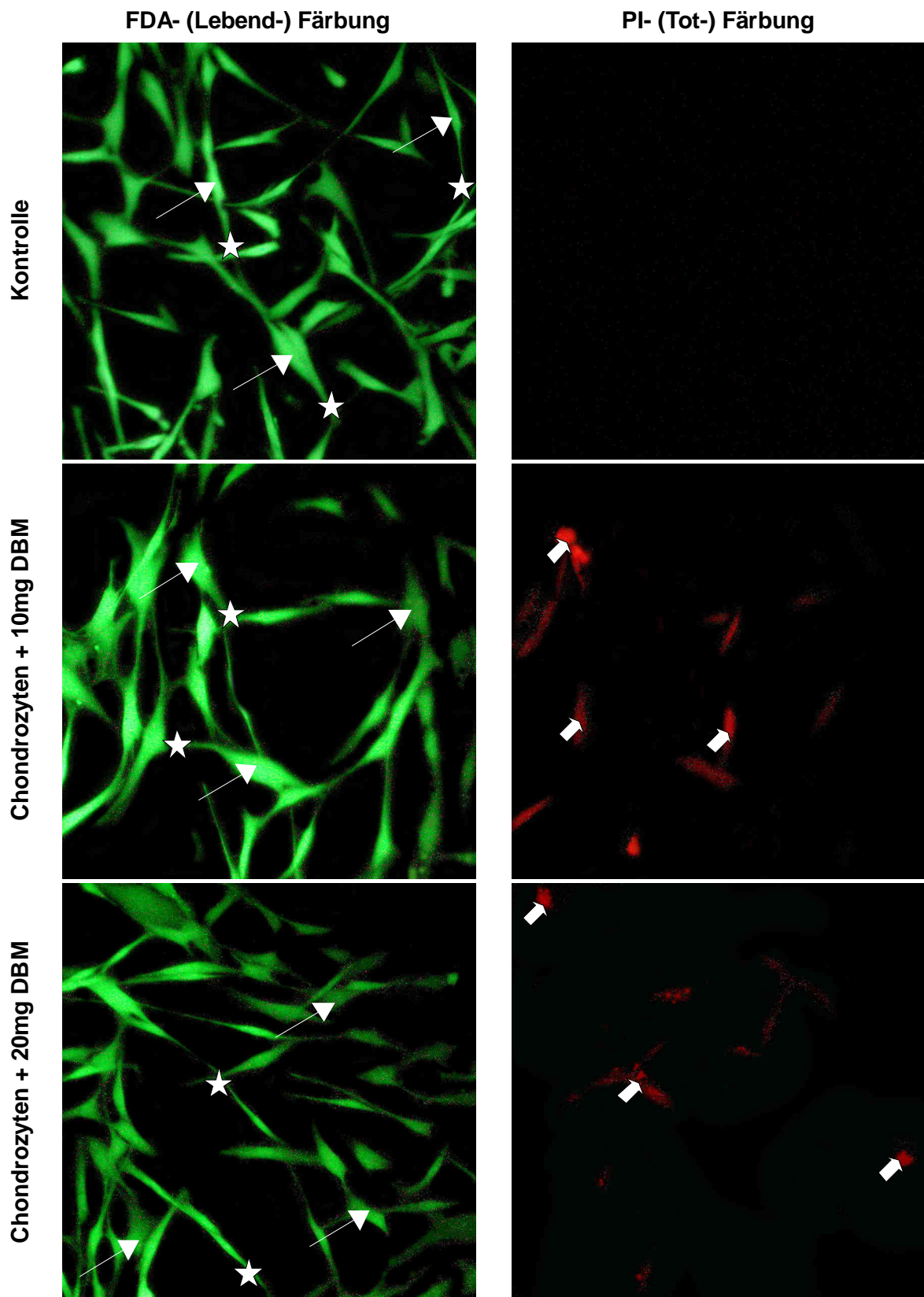
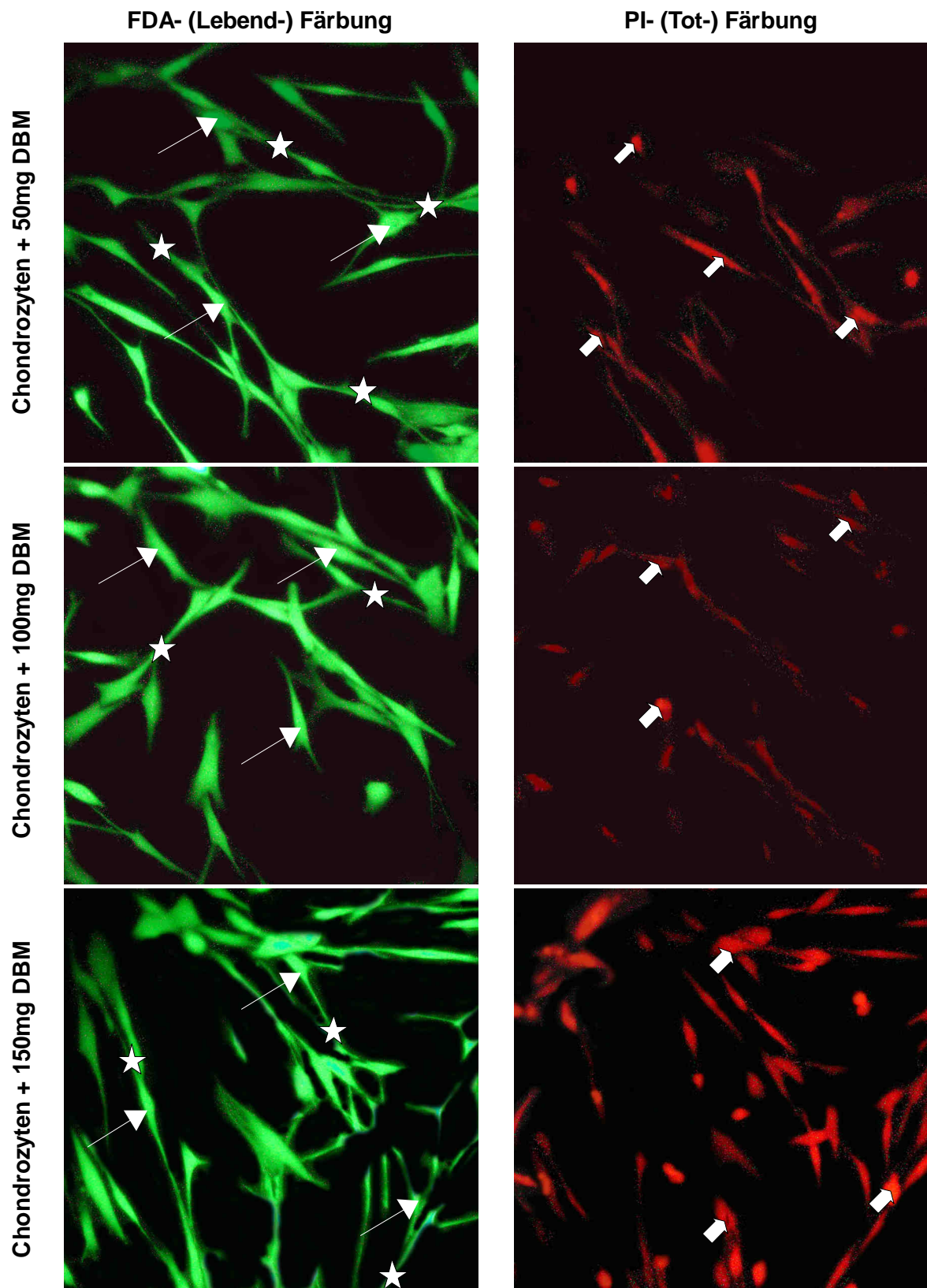


Abb. 33: Chondrozyten nach 96-stündiger Kultivierung mit verschiedenen Dosierungen der DBM; Grüne, lang gestreckte Zellen (\rightarrow), die über Fortsätze (\star) in Kontakt stehen in der Lebend-Darstellung und Zunahme der toten, roten Zellen (\Rightarrow) in der PI-Darstellung mit steigenden Konzentration an DBM; 20-fache Vergrößerung



Fortsetzung Abb. 33: Chondrozyten nach 96-stündiger Kultivierung mit verschiedenen Dosierungen der DBM; Grüne, lang gestreckte Zellen (→), die über Fortsätze (★) in Kontakt stehen in der Lebend-Darstellung und Zunahme der toten, roten Zellen (⇨) in der PI-Darstellung mit steigenden Konzentration an DBM; 20-fache Vergrößerung

Als Kontrolle dienten Chondrozyten, die weder mit DBM in verschiedenen Konzentrationen noch mit deren Zellkulturmedium (CGM) in Kontakt kamen. Auch diese Zellen waren in der Lebend-Färbung deutlich grün angefärbt und imponierten als längliche Zellen (→) und standen über Zellfortsätze (★) in Kontakt. In der Tot-Färbung mit PI konnten keine roten Zellen dargestellt werden.

Die Knorpelzellen, die zusammen mit der DBM in unterschiedlichen Dosierungen über 96 Stunden kultiviert wurden, stellten sich wie die Kontrollen in der FDA-Färbung (Lebend-Darstellung) ähnlich dar. Zellaussparungen auf dem Boden der Mikrotiterplatten an den Stellen, wo sich die DBM befand, konnten in keinem der Ansätze beobachtet werden. Deutliche Unterschiede zeigten jedoch die PI-Färbungen (Tot-Darstellung) der einzelnen Ansätze. Auffallend war eine Zunahme der Anzahl an rotgefärbten Zellen (⇒) mit steigender Konzentration der DBM (Abb. 33). So zeigte der Ansatz mit 150mg DBM die meisten rotgefärbten Knorpelzellen (⇒) in der PI-Färbung, während Zellen, die mit Konzentrationen von 10mg und 20mg DBM kultiviert wurden, sich nur vereinzelt rot anfärbten. Diese Beobachtungen korrelieren mit den bereits beschriebenen Ergebnissen der Proliferationstests.

Unterschiede scheint es auch in der Gesamtzellzahl zwischen den einzelnen Ansätzen zu geben. Betrachtet man sowohl die Lebend-, als auch die Tot-Darstellung der einzelnen Ansätze, scheinen mit steigender Dosierung des demineralisierten Knochens auch mehr Zellen insgesamt vorhanden gewesen zu sein, wovon sich ein Teil grün in der Lebend-Darstellung mittels FDA und ein anderer Teil rot in der Tot-Darstellung mit PI darstellt. So erkennt man in den Ansätzen mit 100mg und 150mg DBM deutlich mehr rot und grün kolorierte Zellen als in den Ansätzen mit 10-50mg DBM bzw. in der Kontrolle. Auch diese Beobachtungen passen zu den Ergebnissen der Proliferationstests, in denen anfänglich der Trend zu höheren Proliferationsraten und Vitalität der Knorpelzellen bei höheren DBM-Konzentrationen zu erkennen war. Nach 96 Stunden kam es jedoch zu einem dosisabhängigen Abfall der Vitalität und dies erklärt die Zunahme der rot gefärbten Zellen mit steigender Dosierung an DBM in den Vitalfärbungen.

Neben der steigenden Anzahl an rot dargestellten Zellen mit zunehmender Dosierung der DBM fällt auch die unterschiedliche Intensität der Rotfärbung in der Tot-Darstellung innerhalb der einzelnen Ansätze auf.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

- Humane Chondrozyten ließen sich gut aus einer kleinen Probe Nasenseptum isolieren und zunächst in einer Monolayerkultur vermehren. In dieser verloren die Knorpelzellen ihre typische rund-ovale Morphologie und dedifferenzierten in längliche Zellen, die untereinander mit Zellausläufern in Kontakt traten und dadurch der Morphologie von Fibroblasten ähnelten. Außerdem verloren die Chondrozyten in der Monolayerkultur ihre Fähigkeit Kollagen II zu produzieren. Stattdessen wurde Kollagen I gebildet.
 - Die Kultivierung von humanen Chondrozyten in der DBM auf Zellkulturbrücken stellte sich als schwierig dar und ist keine primär geeignete Methode zur Kultivierung von Knorpelzellen in der großporigen DBM und führte zum Absterben der Zellen und zur fehlenden Redifferenzierung.
 - Die Herstellung von Chondrozyten-Makroaggregaten ist dagegen eine geeignete Methode, um zunächst ohne Verwendung eines Biomaterials eine 3-D-Struktur zu schaffen, die die Redifferenzierung der Zellen begünstigt. D.h. die Zellen verlieren ihre spindelförmige Zellform, nehmen ihre rund-ovale Gestalt wieder an und beginnen wieder vermehrt Kollagen II zu exprimieren.
 - Nach der Besiedlung der DBM mit den Chondrozyten-Makroaggregaten adhäriert ein Großteil der Zellen innerhalb dieser Knochenmatrix. Dennoch blieb die Zellmorphologie, im Gegensatz zu den reinen Makroaggregaten, überwiegend spindelförmig und die Zellen standen über lang gestreckte Zellausläufer miteinander in Kontakt. Auch konnten nur geringe Mengen Kollagen II nachgewiesen werden, während Kollagen I bis Ende der Kulturzeit nachweisbar blieb. Zusätzlich war der Apoptosemarker Caspase III in den DBM-Chondrozyten-Konstrukten positiv. Auffallend war auch, dass die Makroaggregate, die nur mit dem Zellkulturmedium von der DBM (mit und ohne Zellen) inkubiert wurden, ebenfalls weniger Kollagen II exprimierten und Caspase III nachweisbar war.
-

-
- Die Aufarbeitung der DBM erfolgte u.a. mit Peressigsäure und Chloroform. Der Nachweis einer Freisetzung von Restbestandteilen der Peressigsäure in das Zellkulturmedium mittels Teststreifen gelang nicht. Auch der gaschromatographische Nachweis von Chloroform im Zellkulturmedium war nicht möglich.
 - Die beiden Proliferationstests (WST-1- und BrdU-Test) konnten die bereits histologisch und immunhistochemisch gemachten Beobachtungen untermauern. Zunächst kam es zu tendenziell höheren Proliferationsraten der Chondrozyten, die mit DBM inkubiert wurden, verglichen mit Kontrollen aus Chondrozyten, die kein DBM erhielten bzw. nicht mit deren Zellkulturmedium kultiviert wurden. Es entstand der Eindruck, dass höhere Konzentrationen an DBM das Zellwachstum und damit auch die Vitalität der Zellen zunächst in den ersten 48 Stunden positiv beeinflussten. Doch nach 96 Stunden sank die Vitalität z.T. deutlich unter die der Kontrolle. Je höher die Konzentration der DBM war, desto geringer war die Vitalität der Zellen nach 96 Stunden. Ähnlich verhielt es sich mit den Zellen, die mit dem Zellkulturmedium der DBM kultiviert wurden.
 - Ergänzende Vitalfärbungen (Lebend-Tot-Darstellungen) konnten die mittels eines ELISA-Verfahrens erhobenen Daten der beiden Proliferationstests fluoreszenzmikroskopisch visualisieren. Die mit zunehmender Konzentration an DBM abnehmende Vitalität der Chondrozyten nach 96 Stunden konnte auch hier mittels der Tot-Färbung gezeigt werden.
-

4. Diskussion

Eine Vielzahl von Erkrankungen, wie degenerative oder traumatische Gelenkveränderungen, Tumorerkrankungen, Traumata im Gesichtsbereich und kongenitale Läsionen können mit mehr oder weniger großen Knorpeldefiziten einhergehen. Die geringe Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes limitiert den physiologischen Ersatz von Knorpelgewebe [18, 19], wobei kleinere Defekte durch die Verwendung von autologem Knorpel repariert werden können [21], stößt man bei größeren Läsionen schnell an die Grenzen der Verfügbarkeit ausreichender Spenderressourcen. Das Tissue Engineering von humanem Knorpelgewebe ist für die Rekonstruktion von größeren Knorpeldefekten in der HNO- und Plastisch-Rekonstruktiven-Chirurgie ein viel versprechendes Verfahren. In den letzten Jahren wurde für das Knorpel-Tissue-Engineering eine Vielzahl von dreidimensionalen Trägermaterialien untersucht [31]. Vliesstrukturen aus Polyglykolid, Alginate, Hyaluronsäure und Fibrin sind nur einige der zu nennenden Biomaterialien (Kap. 1.2.2.). Der Knorpelersatz mit Hilfe von Biomaterialien wird u.a. durch unspezifische inflammatorische Reaktionen, fibröse Gewebeveränderungen, Transplantatschrumpfungen, Allergien und Fremdkörperreaktionen erschwert. Trotz der Untersuchung diverser Biomaterialien und der Optimierung von Kultivierungs- und Ernährungsbedingungen, z.B. durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren, ist der klinische Einsatz von „tissue-engineered“ Knorpel in der HNO- und der Plastisch-Rekonstruktiven-Chirurgie auf einzelne Fallberichte begrenzt [30]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der demineralisierten Knochenmatrix, einem Biomaterial, das bereits erfolgreich seit Jahren zur Reparatur von Knochendefekten im Bereich der Unfall- und Kieferchirurgie eingesetzt wird. Da in-vitro Arbeiten zur Eignung der DBM als Trägermaterial für humane Knorpelzellen fast vollständig fehlen, aber für eine erfolgreiche Translation der experimentellen Untersuchungen in die Klinik unerlässlich sind, richtet sich die Arbeit insbesondere auf die Analyse des Proliferationsverhaltens der Chondrozyten in dieser Knochenmatrix, ihr Differenzierungsverhalten und die Untersuchung von möglichen toxischen Effekten dieses Biomaterials. Die Ergebnisse sind für die Abschätzung eines möglichen späteren klinischen Einsatzes im Bereich des Knorpelersatzes überaus bedeutsam.

4.1. Bewertung der Ergebnisse

4.1.1. Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten

In einem ersten Schritt wurde die Besiedlung humaner nasoseptaler Chondrozyten mit dem Trägermaterial der demineralisierten Knochenmatrix (DBM) und deren Eignung für das Tissue Engineering von humanem Knorpelgewebe untersucht. Dafür wurden zunächst aus einer Gewebeprobe einzelne Chondrozyten mittels Verdauung mit Collagenase II isoliert und in einer Monolayerkultur angezogen. Die gewonnene Zellzahl hing im Wesentlichen von der Größe des Gewebestückes ab. Alter und Geschlecht des Spenders hatten keinen signifikanten Einfluss [93]. Das Amplifizieren der Chondrozyten in einer Monolayerkultur ging mit einem Verlust der knorpelspezifischen Matrixproduktion einher. Neben einer Veränderung der Zellmorphologie (Abb. 14) verloren die Zellen vorübergehend die Fähigkeit, Kollagen II zu produzieren und exprimierten stattdessen Kollagen I, das im nativen Knorpelgewebe nicht vorkommt. Dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Vorgang konnte auch in dieser Arbeit in allen Monolayerkulturen beobachtet werden.

Ziel der Kultivierung der humanen Chondrozyten in einer 3-D-Struktur der demineralisierten Knochenmatrix sollte die Redifferenzierung der Zellen und die Bildung von „tissue-engineered“-Knorpel sein. Die histologische und immunhistochemische Auswertungen des ersten Versuchsteiles der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Chondrozyten sich vereinzelt auf und in der DBM vermehrt (Abb. 15) und Kollagen II produziert hatten (schwache Rotfärbung in Abb. 16 B). Der mangelnde Proteinnachweis von Kollagen I und II in den Western-Blot-Analysen und die teilweise apoptotischen Zellen deuteten jedoch darauf hin, dass etliche Chondrozyten abstarben und die verbliebenden Zellen nur ungenügend redifferenzierten. Die Rotfärbung in der immunhistochemischen Kollagen-I-Färbung ließ die Schlussfolgerung einer auch in der DBM bestehenden Dedifferenzierung der Chondrozyten zu (Abb. 16 A). Da die Zellen in Monolayerkulturen grundsätzlich dedifferenzierten und ihre Produktion von Kollagen II auf Kollagen I umstellten [28], ist es denkbar, dass die Kulturzeit von vier Wochen auf der DBM eventuell zu kurz war, um die vollständige Redifferenzierung der Chondrozyten einzuleiten und die Produktion von Kollagen I wieder auf Kollagen II umzustellen. Ein weiterer Grund

kann eine zu geringe Zelldichte in der DBM sein. Dadurch konnten die Knorpelzellen, trotz Zellzahlen von bis zu 5 Millionen pro DBM, in der großporigen Knochenmatrix nicht ausreichend interzelluläre Kontakte ausbilden, was zu einer Verringerung der kollagenen Matrix geführt haben könnte. Der Mangel an Zell-Zell-Kontakten führte wahrscheinlich weiterhin zu einer Verminderung der Ausschüttung von autokrinen Signalen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Chondrozyten haben, indem sie u.a. die Einleitung der Apoptose verhindern [78, 79]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in einem zweiten Teil der Arbeit die DBM mit Chondrozyten-Makroaggregaten besiedelt, die die Ausbildung von lebensnotwendigen Interzellularkontakten gewährleisteten.

Da auch die Freisetzung von proliferationshemmenden oder toxischen Substanzen aus der DBM sowohl den Zelltod als auch die unzureichende Redifferenzierung der Chondrozyten in der DBM erklären könnte, wurde im 3. Versuchsteil unter Berücksichtigung der verschiedenen Arbeiten zur Toxizität der DBM [81-84], mögliche toxische und proliferationshemmende Effekte der DBM auf die Chondrozyten analysiert.

4.1.2. In-vitro-Kultivierung von Chondrozyten-Makroaggregaten in der DBM

Ein wichtiger Schritt im Tissue Engineering von Chondrozyten ist die Einleitung der Redifferenzierung mit Wiederaufnahme der Bildung von Kollagen II. Eine entscheidende Grundvoraussetzung hierfür ist die erneute Anordnung der Knorpelzellen in einer 3-D-Struktur [96, 97]. Dafür wurden aus den Zellen zunächst Makroaggregate gebildet. Die Makroaggregate stellten eine Möglichkeit dar, den Chondrozyten nach der Amplifizierung in der Monolayerkultur die Möglichkeit zu geben, eine 3-D-Struktur mit lebensnotwendigen stabilen Zell-Zell-Kontakten und extrazellulärer Matrix aufzubauen und dadurch die Freisetzung von autokrinen Signalen zu ermöglichen. Auch das „Durchfallen“ der Chondrozyten durch das großporige DBM konnte durch diese Technik verhindert werden. Nach nur 5 Tagen Inkubationszeit hatte sich ein relativ stabiles Makroaggregat aus Chondrozyten formiert und die histologische und immunhistochemische Auswertung zeigte wieder die typische Knorpelzellmorphologie mit rundlichen Zellen, die in ein dichtes Netz aus extrazellulärer Matrix eingebettet waren (Abb. 18 A). Die unterschiedliche

Blaufärbung dieser extrazellulären Matrix in der Alcianfärbung ist als eine unterschiedlich starke chondrogene Differenzierung der Knorpelzellen in dem Makroaggregat zu interpretieren (Abb. 22 A).

Nach einer Gesamtinkubationszeit von nur 21 Tagen begannen die Zellen zu redifferenzieren und das knorpelzelltypische Kollagen II zu bilden (rotgefärbte Matrix in Abb. 25). Dennoch herrschte bis zum Ende dieses Versuches die Bildung eines Ersatzgewebes mit einer weiterhin gering persistierenden Kollagen-I-Produktion vor (Rotfärbung in Abb. 28 A). Es ist hierbei denkbar, dass eine Kultivierungszeit von insgesamt 21 Tagen nicht ausreichend für eine vollständige Redifferenzierung der Zellen war. Unklar bleibt, ob es sich lediglich um Kollagen I handelte, das zu Beginn der Redifferenzierungsphase noch gebildet und dann innerhalb der Matrix dauerhaft eingebettet wurde. Möglich wäre auch, dass nur ein Teil der Zellen in der Lage war, zu redifferenzieren und ein Teil der Chondrozyten im Zustand der Dedifferenzierung verblieb. Ebenso könnten redifferenzierte Zellen in der Lage sein, beide Kollagene zu produzieren [28, 42].

Die Bildung von Makroaggregaten scheint ein sehr geeignetes Verfahren zu sein, um ein "Durchfallen" der Zellen durch die Poren der DBM zu verhindern, in vitro die Redifferenzierung der Knorpelzellen einzuleiten und den Chondrozyten vor Kultivierung auf einem Biomaterial zu ermöglichen, eine 3-D-Struktur auszubilden [86].

4.1.2.1. Analyse des Zellkulturmediums (CGM) auf Chloroform und Peressigsäure

Die demineralisierte Knochenmatrix (DBM) wird nach Entnahme aus der Leiche in einem Mehrschrittverfahren u.a. mit Peressigsäure und Chloroform bearbeitet, um ein antigen- und keimfreies Biomaterial zu erhalten [63, 64]. Mögliche Restbestände von Peressigsäure und Chloroform können in vitro als auch in vivo toxisch auf die Zellen und in höheren Konzentrationen auf den Organismus wirken. Die farblose Flüssigkeit Chloroform wurde bereits 1848 als Narkotikum eingesetzt. Die Dämpfe verursachen Bewusstlosigkeit und heben die Schmerzempfindung auf. Aufgrund der toxischen Wirkung auf Herz, Leber und anderen inneren Organen wird Chloroform heute nicht mehr als Narkosemittel angewendet. Es steht außerdem unter Verdacht, krebserregend zu sein [98]. Peressigsäure (PES) ist dagegen ein stark oxidierender

Stoff, der aufgrund dieser Wirkung auch als Desinfektions- und Sterilisationsmittel eingesetzt wird.

Eine Freisetzung dieser beiden Substanzen aus der DBM könnte für eine proliferationshemmende Wirkung bzw. sogar für den Zelltod der Chondrozyten verantwortlich sein. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch PES nicht im Nachweisbereich der Teststreifen im Zellkulturmedium kolorimetrisch nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Sensitivität der Teststreifen (Farbumschlag erst ab PES-Konzentrationen von $>0,5\text{mg/dl}$), kann lediglich festgestellt werden, dass die Konzentrationen der PES unterhalb der Nachweisgrenze dieses Messverfahrens lagen und wenn PES aus der DBM freigesetzt wurde, die Werte $<0,5\text{mg/dl}$ waren. Damit lässt sich eine toxische Wirkung durch PES jedoch nicht vollständig ausschließen, denn bereits die Freisetzung von kleinsten Restbeständen könnte womöglich eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausüben.

Der Gehalt an Chloroform wurde gaschromatographisch analysiert. Die gemessenen Konzentrationen am Tag 3, 9 und 14 im CGM lagen unter der Nachweisgrenze des Messverfahrens (toxikologisches Institut). Es ist denkbar, dass auch erst die Summe einzelner Restbestände Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen haben und in höheren Konzentrationen sogar zum programmierten Zelltod führen kann. Zu bedenken ist auch, dass ein Teil des in der DBM-befindlichen Chloroforms mit Sauerstoff photochemisch zersetzt wird und dabei Phosgen, Chlor und Chlorwasserstoff entstehen, die ebenfalls wieder zellschädigend wirken können. Ein Teil des Chloroforms könnte aufgrund der chemischen Reaktionen dem gaschromatographischen Nachweis entgangen sein. Zur genauen Darstellung einer möglichen Toxizität der Restbestände und zur Bestimmung von Konzentrationen, die für einzelne Zellen *in vitro* schädigend sind, müsste die Analyse des Zellkulturmediums der DBM auf alle Chemikalien und ihre möglichen Reaktionsprodukte erweitert werden, die für die Aufarbeitung der demineralisierten Knochenmatrix notwendig waren und toxische Konzentrationen *in vitro* gesondert getestet werden. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass spezielle Aufarbeitungsformen von demineralisierter Knochenmatrix [36, 81-83] toxische Effekte auf die Zellen haben können. Studien, die einen toxischen Effekt demineralisierter Knochenmatrix, die mit Peressigsäure und Chloroform aufgearbeitet wurde, nachweisen, gibt es bisher nicht und ein toxischer Effekt der DBM konnte auch in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

4.1.2.2. Die Kultivierung der Chondrozyten-Makroaggregate in der DBM bzw. mit dem Zellkulturmedium der DBM

Nach Formung der Makroaggregate über einen Zeitraum von 5 Tagen wurden diese auf die DBM gegeben und diese Konstrukte über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert (Ansatz 4). Im Gegensatz zu der einfachen Besiedlung der DBM mit Knorpelzellen (Versuchsteil I) war es mit dieser Methodik möglich, Knorpelzellen in der DBM in einem größeren Umfang zu vermehren. Doch im Gegensatz zu den Makroaggregaten hatten die Zellen ihren typischen Phänotyp nicht wieder angenommen. Im Gegenteil, die Zellen waren länglich und über Zellausläufer miteinander verbunden und ähnelten der Morphologie von Fibroblasten (Abb. 20). Auch die Einleitung der Redifferenzierung fand in einem geringeren Umfang statt, als in den Chondrozyten-Makroaggregaten ohne DBM (Ansatz 2). Sowohl der Nachweis von bläulich gefärbten knorpeltypischen sulfatierten Glykosaminoglykanen in der Alcianblau-Färbung (Abb. 23 B) als auch der immunhistochemische Kollagen-II-Nachweis (rötliche Areale in Abb. 26 B) fiel deutlich geringer aus als im Ansatz 2 (Abb. 23 A, 26 A). Dagegen wurde die extrazelluläre Matrix deutlich in der immunhistochemischen Kollagen-I-Färbung rot angefärbt und kann als ein Dominieren der Kollagen-I-Fasern in diesem DBM-Zell-Konstrukt gewertet werden (Abb. 29)

Die immunhistochemischen Färbungen haben nicht nur eine unzureichende Redifferenzierung gezeigt, sondern auch, dass es z.T. zur Einleitung der Apoptose in den Knorpelzellen kam (Abb. 32). So konnte nach 14 Tagen Zellkontakt mit DBM deutlich Caspase III nachgewiesen werden. Neben bläulicher, interzellulärer Matrix umgaben auch rötliche, hofartig formierte Areale die Chondrozyten und können als Ausdruck einer Apoptose der Knorpelzellen mit Freisetzung von Caspase III interpretiert werden (Abb. 32). In dem Kontrollansatz, der keinen Kontakt mit der demineralisierten Knochenmatrix hatte, konnte nach gleicher Inkubationszeit keine Caspase III dargestellt werden (Fehlen der Rotfärbung in Abb. 31 A).

In einem anderen Versuchsansatz wurden die Chondrozyten-Makroaggregate mit CGM der Ansätze 3 (DBM ohne Chondrozyten-Makroaggregat) und 4 (DBM mit Chondrozyten-Makroaggregat) ernährt und ebenfalls mit diesem Medium 14 Tage inkubiert. Weder makro- noch mikroskopisch konnte ein Unterschied beobachtet werden, ob das Makroaggregat Zellkulturmedium von der DBM mit oder ohne

Chondrozyten-Makroaggregat (Ansatz 3 bzw. 4) erhielt. Im Gegensatz zu den Konstrukten aus DBM und Chondrozyten-Makroaggregat hatten hier die Zellen ihre knorpeltypische Morphologie wieder angenommen (Abb 18): d.h. die Zellen erschienen rund und die langen Zellfortsätze, wie man sie in der Monolayerkultur und in den DBM-Zell-Konstrukten gesehen hat, waren hier nicht mehr zu erkennen. Ähnlich wie bei den histologischen und immunhistochemischen Abbildungen der DBM mit Chondrozyten wurde auch in diesem Ansatz deutlich weniger Kollagen II exprimiert als bei dem Chondrozyten-Makroaggregat, das weder mit DBM noch mit deren CGM in Kontakt kam (Abb. 25). Dafür konnte ein höherer Anteil an dedifferenzierten Zellen, eingebettet in rot angefärbten Kollagen-I-Fasern, nachgewiesen werden (Abb. 28 B). Auffallend war auch hier die positive immunhistochemische Färbung für Caspase III (Abb. 31 B).

Offenbar kam es während der in-vitro-Kultivierung der Chondrozyten-Makroaggregate in der DBM und der Makroaggregate, die mit dem Zellkulturmedium der DBM mit und ohne Zellen kultiviert wurden, zur Apoptose und peristierender Dedifferenzierung. Daraus ergeben sich zwei Fragen:

- Was waren die Ursachen für die Einleitung der Apoptose in den Chondrozyten, die mit der DBM direkt in Kontakt standen bzw. deren Medium erhielten?
- Wie kann man die unzureichende Redifferenzierung der Chondrozyten in diesen Ansätzen erklären?

Was waren die Ursachen für die Einleitung der Apoptose in den Chondrozyten?

Aus dem Vergleich der Ansätze 4-6 kann geschlussfolgert werden, dass der direkte Kontakt der Zellen mit der DBM nicht erforderlich war, um zu einem geringeren Grad an Redifferenzierung und Vitalität der Zellen zu führen, d.h. die großporige 3-D-Struktur schien zunächst keinen direkten Einfluss auf die Vitalität der Zellen zu haben. Sowohl die Chondrozyten, die direkt mit der DBM in Kontakt kamen, als auch die Zellen, die nur mit dem Zellkulturmedium der DBM mit oder ohne

Chondrozyten kultiviert wurden, zeigten die Einleitung der Apoptose und Dedifferenzierung. Somit scheinen im Kulturmedium gelöste oder fehlende Faktoren dafür verantwortlich gewesen zu sein. In Frage kommen daher z.B. toxische Substanzen, Nährstoffe oder Wachstumsfaktoren.

Hinweise auf eine mögliche Freisetzung von toxischen Substanzen ergaben sich nicht, auch wenn nur ein kleines Spektrum an verdächtigen Substanzen untersucht werden konnte.

Die Einleitung eines programmierten Zelltodes und damit der Expression von Caspase III erfolgt nicht nur durch toxische Substanzen. Weitere Ursachen für das Absterben von Zellen können auch Nährstoff- und Sauerstoffmangel und der Entzug von Wachstumsfaktoren sein [89, 90]. So könnte eine schnelle Vermehrung und die daraus resultierende hohe Zahl an Knorpelzellen in der DBM zu einem Nährstoffmangel geführt haben. Weder der fehlende Indikatorumschlag des Zellkulturmediums als Zeichen eines deutlich erhöhten Nährstoffverbrauchs, noch die Tatsache, dass die Kontrollzellen nicht Caspase-III-positiv waren, sprechen gegen diese Option. In Studien konnte gezeigt werden, dass akuter Nährstoff- und Sauerstoffmangel in einem Gewebe eher zu Nekrosen, also einem unkontrollierten Zellkollaps mit nachfolgendem Zelltod, als zum programmierten Zelltod führen. So kann man in Tumorgeweben mit zentral vermindert durchbluteten Arealen vermehrt nekrotische Zellgruppen bzw. Gewebe finden [99]. Die Nekrose stellt damit einen passiven Zelltod dar, der auf einer unmittelbar tödlichen Zellschädigung beruht. Die Apoptose dagegen ist ein vorbereitetes Programm, das einem Organismus ermöglicht, sich überflüssiger oder schadhafter Zellen zu entledigen [99]. Dafür werden bestimmte Enzyme benötigt, die Caspasen, deren Nachweis in den immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit den Zelluntergang in Form von Nekrosen unwahrscheinlich macht. Welche anderen Ursachen für eine Induktion der Apoptose in den humanen Knorpelzellen kamen während des vorliegenden Versuches noch in Frage? Prinzipiell kann jede ausgeprägtere Störung des extrazellulären Milieus wie Temperaturveränderungen, reduziertes Nährstoffangebot, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hormone und DNA-Schäden durch Infektionen, UV-Strahlung oder toxische Substanzen als Stimuli für die Induktion des programmierten Zelltodes dienen [89, 90, 99]. Während des Versuches gab es jedoch keine Temperaturschwankungen, denn die Zellen wurden bei konstanten

37°C inkubiert. Hormone, Infektionen sowie UV-Strahlung spielten in diesem Versuchsaufbau ebenfalls keine Rolle.

Vor dem Hintergrund des Nachweises eines löslichen Mediators der Apoptose kann der Mangel bzw. Entzug von Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass aus der demineralisierten Knochenmatrix (DBM) in Kultur Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , FGF- β , BMP oder IGF freigesetzt werden [65] und diese Faktoren auch die Chondrogenese induzieren können [66-69]. Der Fibroblast-Growth-Factor- β (FGF- β) hat z.B. einen entscheidenden Einfluss auf die Redifferenzierung und damit auch auf die Wiederaufnahme der Kollagen-II-Produktion, während die Bone-morphogenetic-proteins (BMPs) bedeutend für die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Knorpel- und Knochenzelllinien sind [100, 101]. Der Entzug von Wachstumsfaktoren könnte auch in dieser vorliegenden Arbeit die Ursache für die Einleitung der Apoptose sowohl bei den Knorpelzellen sein, die direkt mit der DBM in Kontakt kamen, als auch bei den Zellen, die das Zellkulturmedium von der DBM mit oder ohne Zellen erhielten. Folgender Mechanismus könnte diesen Prozeß erklären: in den ersten Tagen in Kultur kommt es zum Herauslösen der beschriebenen Wachstumsfaktoren wie FGF- β , BMP und IGF durch das Zellkulturmedium. Dieser zusätzliche Stimulus führte zunächst zu gesteigerten Vermehrungsraten der Knorpelzellen. Durch den Verbrauch dieser Wachstumsfaktoren, angesichts des gesteigerten Bedarfs durch die erhöhte anfängliche Vermehrungsrate und durch den Wechsel des kompletten Zellkulturmediums alle 2-3 Tage könnte es zu einem relativen Entzug dieser wichtigen Wachstumsfaktoren gekommen sein. Nachfolgend wurde dann in den Zellen der programmierte Zelltod eingeleitet, indem u.a. Caspasen aktiviert wurden, die den systematischen Um- und Abbau der Zelle und ihrer DNA mitverursachen. Da Knorpelzellen selbst in der Lage sind in einem geringen Umfang Wachstumsfaktoren zu bilden [78], kann dies erklären, dass nicht zwangsläufig in allen Knorpelzellen Apoptose eingeleitet wurde, sondern für eine begrenzte Anzahl an Chondrozyten die verbleibenden Wachstumsfaktoren ausreichend waren. Dazu passend fand sich ein Nebeneinander von vitalen und Caspase-III-positiven Chondrozyten (Abb. 31 B, 32).

Wie kann die mangelnde Redifferenzierung der Chondrozyten erklärt werden?

Zwar konnte während der Kultivierungsdauer die Redifferenzierung der Zellen, gemessen an der Wiederaufnahme der Kollagen-II-Expression, eingeleitet werden, doch wurde bis zum Ende des Versuches eine überwiegende Kollagen-I-Produktion in den Ansätzen nachgewiesen, wo die Chondrozyten mit DBM oder deren Medium in Kontakt kamen. Die Redifferenzierung und die Wiederaufnahme der Kollagen-II-Produktion sind für die spezifische Funktion des Knorpelgewebes unerlässlich. Im Gegensatz zu den Makroaggregaten waren die Zellen in der DBM spindelförmig, traten mit langen Zellfortsätzen untereinander in Kontakt und glichen der Morphologie von Fibroblasten. Ein Mangel an Wachstumsfaktoren, insbesondere des für die Redifferenzierung wichtigen FGF- β [100] könnte auch hier eine der Ursachen gewesen sein und sowohl die Morphologie der Zellen in der DBM, als auch die unzureichende Expression von Kollagen II erklären. Die rundliche Form der Knorpelzellen in den Makroaggregaten, die mit Medium aus den Ansätzen mit DBM kultiviert wurden, war eher Folge der primären Formung dieser Makroaggregate vor Ernährung der Zellen mit dem CGM aus den DBM-Ansätzen. Im Gegensatz dazu kann die großporige Struktur der DBM eine Erklärung für die spindelförmige Morphologie der Zellen in der DBM sein.

Die Porengröße und die Porosität eines Biomaterials sind entscheidend für die Integration von Zellen in das Biomaterial und letztendlich für die Qualität des „engineered tissue“, des neugebildeten Gewebes. Einerseits muss die Porosität des Trägermaterials ausreichend Raum für Zellvermehrung und Ausbildung von extrazellulärer Matrix lassen, andererseits darf sie aber nicht zu hoch sein und damit Zelladhäsion und Invasion der Zellen in das Biomaterial erschweren [102]. Wie die Abbildung 5 zeigt, ist die in dieser Arbeit verwendete demineralisierte Knochenmatrix sehr großporig und erschwerte möglicherweise zunächst die Aufnahme von Zellkontakten, die u.a. über Integrinrezeptoren mit der Oberfläche der DBM entstanden [30]. Zur Kontaktaufnahme und zum Auskleiden der Poren mit Knorpelzellen war somit anfänglich eine starke Zellvermehrung notwendig. Die Expansion der Knorpelzellen aus den Makroaggregaten in die großporige DBM ging jedoch mit einer verringerten Produktion von extrazellulärer Matrix einher. Knorpelzellen sind erst dann in der Lage, vermehrt extrazelluläre Matrix zu produzieren, wenn sie sich nicht mehr stark teilen [103]. Gut erkennbar ist dieses

Phänomen der verringerten Produktion an extrazellulärer Matrix an den langgestreckten, auseinandergesetzten Zellen mit einem ausgedehnten Netz an Zellfortsätzen (HE-Färbung: Abb. 20; Kollagen-I-Darstellung: Abb. 29), die sich von einem DBM-Oberflächenrand zum nächsten aufspannen.

An der Wiederaufnahme der - wenn auch geringen - Kollagen-II-Produktion ist erkennbar, dass ein Impuls zur Redifferenzierung gegeben wurde. Wie bereits diskutiert, könnte es sich bei dem immunhistochemisch nachgewiesenen Kollagen I entweder um solches handeln, das zu Beginn der Redifferenzierungsphase noch gebildet wurde oder um Kollagen I, das bei fehlender Redifferenzierung der Chondrozyten dauerhaft produziert wurde. Auch die Doppeldarstellung von Kollagen I und II durch redifferenzierte Zellen wäre denkbar [28, 42]. Des Weiteren wurden die Knorpelzellen über einen Zeitraum von 14 Tagen in der DBM kultiviert, während für eine weitergehende Redifferenzierung möglicherweise längere Kultivierungszeiten nötig wären.

4.1.2. Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation der Chondrozyten in Abhängigkeit von der Dosierung der DBM und der Kultivierungsdauer (24, 48 und 96 Stunden) mit zwei voneinander unabhängigen Proliferationstests untersucht und zusätzlich durch Vitalfärbungen visualisiert.

Die beiden Proliferationstests untersuchten die Proliferation der Chondrozyten auf unterschiedliche Art. Während der eine Test die enzymatische Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen (WST-1-Test) nutzte, beurteilte der andere (BrdU-Test) die Lebensfähigkeit und Proliferation der Zellen über den Einbau von Uridin in die Knorpelzell-DNA. Die fast identischen Ergebnisse der beiden Tests und die hohe Korrelation mit den Vitalfärbungen unterstützen die Ergebnisse und Beobachtungen der in-vitro Kultivierung (Teil I und II) in dieser Arbeit und zeigen, dass sowohl der WST-1- als auch der BrdU-Test geeignete Verfahren sind, um Proliferations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen an humanen nasoseptalen Knorpelzellen durchzuführen.

Die geringe Anzahl an Proben im dritten Versuchsteil lässt keine statistische Aussage über die Signifikanz des Zeitverlaufs der Proliferationstests zu. Dennoch ist eine

eingeschränkte Aussage über die Tendenz der zu- oder abnehmenden Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration der DBM und der Kultivierungsdauer möglich. Diese Aussagen stützen sich insbesondere auf die hohe Korrelation der Ergebnisse der unterschiedlichen Tests zusammen mit den histologischen, immunhistochemischen Ergebnissen und den Resultaten der Vitalfärbungen.

Höhere Dosierungen von DBM (100mg und 150mg) hatten in den ersten 48 Stunden einen positiven Effekt auf die Proliferation und die Vitalität der Chondrozyten. Nach 96 Stunden kam es zu einer Umkehr der Ergebnisse, d.h. höhere Konzentrationen von DBM erwiesen sich nun als nachteilig und zeigten sich in einer reduzierten Vitalität im Vergleich zur Kontrolle (Diagramme 1 und 2). Konzentrationen von 10mg und 20mg DBM hatten dagegen kaum einen Einfluss auf die Proliferation und damit auch auf die Vitalität der Zellen. Insgesamt zeigt sich also eine initiale DBM-dosisabhängige Steigerung der Proliferation und eine anschließende ebenfalls dosisabhängige Reduktion der Proliferation bzw. Vitalität. Allein die günstige 3-D-Struktur der DBM kann dieses Phänomen nicht erklären, denn nach 96 Stunden konnten noch keine in die DBM gewachsenen Chondrozyten nachgewiesen werden.

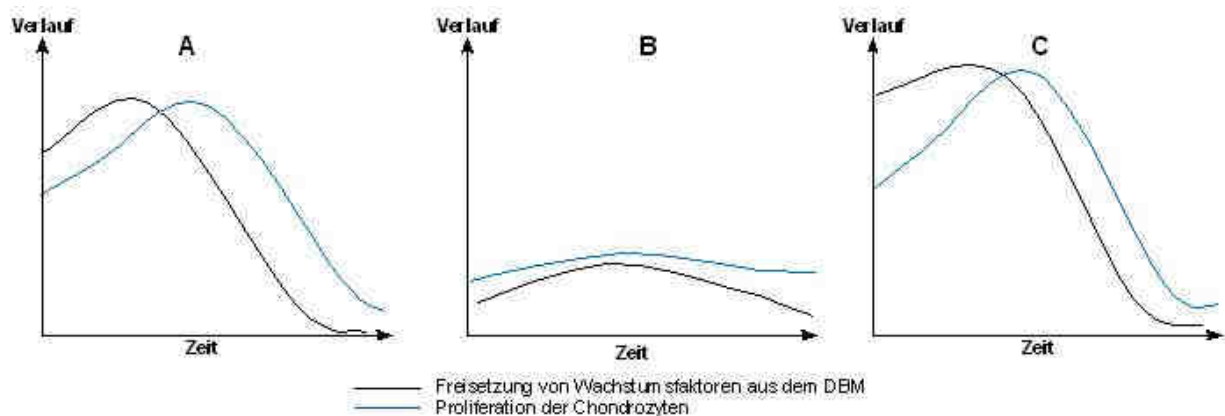


Abb. 34: Schematische Darstellung des möglichen Zusammenhangs zwischen der Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der DBM und der Proliferation der Chondrozyten im Ansatz 4 mit hohen DBM-Konzentrationen (A) und geringen DBM-Konzentrationen (B) und im Ansatz 5 bzw. 6 (C).

Die bereits diskutierte Freisetzung von diversen Wachstumsfaktoren aus der DBM und deren chondrogene Wirkung sind mit diesem Befund gut vereinbar. Geringere Konzentrationen an DBM könnten zu einer geringen initialen Freisetzung an Wachstumsfaktoren und damit auch zu einer geringeren Vitalität als bei höheren

Dosierungen führen. Die Mengen an freigesetzten Wachstumsfaktoren in 10-50mg DBM waren wahrscheinlich so gering, dass bei einem Abfall dieser Faktoren durch Verbrauch und Wechsel des Mediums der längerfristige Einfluss auf die Vitalität der Zellen nur gering war und diese nach 96 Stunden nur minimal geringere Proliferationsraten als die Kontrollzellen zeigten (Abb. 34-B). Dieser geringe Einfluss könnte mit der Fähigkeit der Chondrozyten zusammenhängen, selbst in gewissen Mengen Wachstumsfaktoren zu bilden [103]. Höhere Konzentrationen an DBM (100-150mg DBM) enthalten vermutlich auch höhere Mengen an Wachstumsfaktoren und die anfängliche stärkere Freisetzung dieser könnte den stärkeren Anstieg der Proliferation und Vitalität der Zellen in den ersten 48 Stunden und auch den Abfall nach 96 Stunden erklären (Abb. 34-A). Eine starke relative Reduktion dieser Faktoren kann über die bereits beschriebenen Wege zur Einleitung der Apoptose und somit zu einer geringeren Vitalität nach 96 Stunden in den beiden Proliferationstests im Vergleich zur Kontrolle geführt haben (Abb. 34-A). Die knorpelzelleigene Produktion an Wachstumsfaktoren schien dieses Defizit nicht ausgleichen zu können. Eine negative Rückkopplung, d.h. die Hemmung der knorpelzelleigenen Produktion durch hohe Konzentrationen an extern zugeführten Wachstumsfaktoren könnte eine weitere mögliche Erklärung für den Abfall nach 96 Stunden sein.

Ähnlich verhielt es sich mit den Chondrozyten, die das Medium der DBM-Ansätze (Ansatz 5 und 6) erhielten. In den ersten 48 Stunden lag die Vitalität der Zellen tendenziell höher als bei den Zellen, die direkt mit der DBM in Kontakt standen (Diagramme 3-6). Während der Inkubation der DBM im Zellkulturmedium könnte es zu einer Freisetzung von diversen Wachstumsfaktoren [65] in das Medium über einen längeren Zeitraum gekommen sein. Durch das Fehlen an Zellen in Ansatz 3 konnten diese aber nicht verbraucht werden und durch die knorpelzelleigene Produktion in Ansatz 4 lagen möglicherweise die Wachstumsfaktoren bei der Zugabe dieser Medien zu den Chondrozyten der Ansätze 5 und 6 in höheren Konzentrationen vor und führten zu deutlich höheren Proliferationsraten als bei den Kontrollzellen und Ansatz 4 (Abb. 34-C). In diesem standen die Knorpelzellen direkt mit der DBM in Kontakt, so dass freigesetzte Wachstumsfaktoren verbraucht wurden und die relative Konzentration im Medium geringer war als im Ansatz 3. Nach Erschöpfung der Reserven an Wachstumsfaktoren in der DBM kam es auch in den Ansätzen 5 und 6, im Vergleich zu den Kontrollzellen, zu einem deutlichen Abfall der Vitalität mit

Einleitung der Apoptose, insbesondere bei hohen Konzentrationen an DBM. Als Ursachen sind die gleichen anzunehmen, die im Ansatz 4 diskutiert wurden.

Die Lebend-Tot-Darstellungen (Abb. 33) der Chondrozyten nach 96 Stunden visualisieren sehr gut die durch den ELISA erhaltenen Ergebnisse. So kam es nach 96 Stunden mit steigenden Konzentrationen an DBM zu einem vermehrten Absterben der Chondrozyten (Abb. 33). Konzentrationen von 10-20mg DBM führten nur zu einem geringen Abfall der Vitalität in den Proliferationstests und nur zu einer vereinzelt Darstellung abgestorbener Zellen in der Tot-Färbung.

Nach 96 Stunden konnten noch keine eingewachsenen Knorpelzellen in der DBM nachgewiesen werden. Ursachen könnten dafür sein: 1. die Zellen hatten noch keine ausreichend starken Zellkontakte zur Oberfläche der DBM ausgebildet und wurden evtl. durch die einzelnen Waschschrte während der Vitalfärbung aus der DBM hinausgespült oder 2. nach 96 Stunden hatten die Knorpelzellen noch nicht angefangen, Kontakt zur Oberfläche der DBM aufzunehmen und in dieses hineinzuwachsen.

Die zeitliche Dynamik der Proliferationsraten entspricht ähnlichen Studien aus der Literatur. Die Arbeit aus dem Jahre 2008 von Abdullah et al. [76] beschreibt Proliferationsuntersuchungen an Chondrozyten, die mit DBM in vitro kultiviert wurden. Mittels des MTT-Tests (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide-Assay) konnten zunächst ebenfalls steigende Proliferationsraten der Chondrozyten in der DBM beobachtet werden. Zu einem Abfall der Proliferation und der Zellvitalität kam es in dieser Arbeit erst zwischen dem 5. und 7. Tag. Die Menge an verwendeter demineralisierter Knochenmatrix war in dieser Arbeit deutlich höher als in der vorliegenden und könnte somit den späteren Abfall der Proliferationsraten erklären. Leider ging die Arbeit nicht der Frage nach, warum es nach dem 5. Tag zu einem Abfall der Zellvitalität kommt und diskutiert nur eine mögliche Konkurrenz der Zellen um Nährstoffe. Für diese Hypothese finden sich in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise. Ein relevanter Nährstoffverbrauch, mit Einfluss auf die Vitalität von Zellen, geht in der Regel mit einer Veränderung der Mediumfarbe einher. Dabei führen der Verbrauch von einzelnen Mediumbestandteilen und die gesteigerte Bildung von sauren Stoffwechselendprodukten zu pH-Veränderungen mit konsekutiver Gelbfärbung des Zellkulturmediums (Indikatorumschlag). Dies konnte zu keinem Zeitpunkt in den durchgeführten Experimenten beobachtet werden und auch der negative Nachweis von toten Zellen in den Vitalfärbungen der Kontrollen sprechen

gegen einen Nährstoffmangel als Ursache für die sinkende Vitalität in den Proliferationstests. Auch die in-vitro-Kultivierung von Chondrozyten in der DBM über einen Zeitraum von 14 Tagen im Teil II dieser Arbeit zeigte keine Farbveränderungen des Mediums und auch der Nachweis von Caspase III war in den Kontrollansätzen nicht möglich.

Die Proliferationsuntersuchungen mittels ELISA sind ein weiterer Beleg gegen die toxische Wirkung der DBM durch Freisetzung von Restbeständen, wie z.B. Peressigsäure oder Chloroform. Die höchste Freisetzung von Restbeständen nach der Aufarbeitung der DBM erfolgt vermutlich in den ersten Stunden bzw. Tagen. Im Widerspruch dazu stehen die zunächst tendenziell ansteigenden Proliferationsraten der Chondrozyten in den ersten 48 Stunden. Ein toxischer Effekt der DBM würde sich jedoch gerade in den ersten 1-2 Tagen nachteilig auf das Wachstum auswirken. Die Arbeit von Jäger et al. [82] weist darauf hin, dass weniger eine direkte Freisetzung von toxischen Restbeständen aus der DBM auftritt, sondern dass durch spezielle Aufarbeitungen der demineralisierten Knochenmatrix eine exzessive Wasserstoffionenfreisetzung mit konsekutivem pH-Wert-Abfall in den Zellkulturen stattfindet. In der Arbeit wird ebenfalls die Freisetzung dieser H^+ -Ionen vor allem in den ersten Stunden beschrieben. Der Abfall der Zellvitalität erst nach 96 Stunden in den Proliferationstests der vorliegenden Arbeit und nach 5 Tagen in der Arbeit von Abdullah [76] ist jedoch mit der höchsten Toxizität durch Wasserstoffionen aus der DBM in den ersten Stunden nicht erklärbar. Ferner ist die Fähigkeit einer Pufferung von DMEM-haltigen Medien von H^+ -Ionen beschrieben worden [82].

4.2. Ausblick und Beurteilung der Eignung der DBM im Tissue Engineering von humanem Knorpelgewebe

Die einfache Handhabung der DBM, die gute Biodegradierbarkeit [70, 71], die chondrogene Wirkung [53, 65-69, 104] sowie gute klinische Erfahrungen in der Korrektur von Knochendefekten in der Unfallchirurgie [54, 55] und Kopf-Hals-Chirurgie [57, 58] machen die demineralisierte Knochenmatrix zu einem interessanten Trägermaterial für zukünftiges Tissue Engineering von humanen Knorpelzellen. Im Gegensatz zu viel versprechenden in-vivo-Experimenten u.a. im Kaninchen [70, 71, 73] und einer ersten klinischen Anwendung von demineralisierter Knochenmatrix als Trägermaterial für nasoseptalen Knorpel bei einem Kind [75] ergaben sich in den eigenen in-vitro-Arbeiten Schwierigkeiten bei der Kultivierung von Chondrozyten in der demineralisierten Knochenmatrix, da viele Knorpelzellen starben oder ungenügend redifferenzierten. Erst die Bildung von Makroaggregaten vor der Zugabe der Zellen auf die DBM ermöglichte den Knorpelzellen, in die DBM einzuwachsen.

In dieser Arbeit konnte prinzipiell gezeigt werden, dass die Kultivierung von DBM mit humanen Chondrozyten möglich ist und auch die Redifferenzierung der Knorpelzellen eingeleitet werden konnte. Einer praktikablen, klinischen Anwendung der demineralisierten Knochenmatrix für die Bildung von Ersatzknorpel stehen aber derzeit noch mehrere Probleme gegenüber: die großporige Struktur der DBM, die eine vorherige Formierung der Chondrozyten zu einer 3-D-Struktur notwendig macht, die unzureichende Redifferenzierung der Zellen und die noch nicht eindeutig geklärten Ursachen der Apoptose der Chondrozyten in der DBM.

Zur Lösung dieser Probleme sind weitere Experimente erforderlich. Neben einer Analyse auf mögliche weitere toxische Restbestände in der DBM, ist auch die Identifikation und Quantifizierung von wahrscheinlich freigesetzten Wachstumsfaktoren aus der DBM von Bedeutung, denn so sind z.B. sowohl die Rezeptoren als auch die genaue Signalkette der Bone-Morphogenetic-Proteine (BMP) nur unzureichend bekannt [105, 106]. Weiterführende Arbeiten sollten daher den Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Kultivierung von humanen Knorpelzellen in der DBM untersuchen. So haben beispielsweise mehrere publizierte Arbeiten den bedeutsamen Einfluss von FGF-2 und TGF- β auf die Redifferenzierung und Proliferation von Knorpelzellen und die Notwendigkeit von BMP-2 für den Erhalt der knorpelzelltypischen

Morphologie während der 2-D- und 3-D-Kultivierung in vitro [100, 103] gezeigt. Auch die Verwendung von humanem Serum anstelle von fetalem Kälberserum zeigte eine erhöhte Knorpelproliferation und verbesserte Produktionsraten von knorpeltypischer extrazellulärer Matrix [107]. Somit ist humanes Serum ein interessanter Zusatzstoff für Zellkulturmedien in weiterführenden Arbeiten. Denkbar ist schließlich, dass eine Kombination von humanem Serum und Wachstumsfaktoren während der Kultivierung nicht nur die Redifferenzierung verbessert, sondern auch sinkende Proliferationsraten und die Einleitung des programmierten Zelltodes verhindert, nachdem die Wachstumsfaktoren aus der DBM verbraucht sind. Mit Hilfe solcher Modifikationen kann der klinische Einsatz von „tissue-engineered“ Knorpel mit DBM auch in naher Zukunft ein realistischer Ansatz bleiben.

Für die erfolgreiche Translation der experimentellen Ergebnisse in eine klinische Anwendung ist es stets erforderlich, die Eigenschaften eines Biomaterials und die Wechselwirkungen mit anderen Zellen zu analysieren sowie eine Toxizität auszuschließen. Doch können diese in-vitro-Experimente einen Organismus nicht ausreichend simulieren und die Wirkung dieser Biomaterialien auf einen Organismus nicht vollständig abschätzen lassen. So können beispielsweise die statischen Zellkulturbedingungen zu atypischer Proteinexpression der Chondrozyten führen, die wiederum in vivo Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen hervorrufen können [108]. Deshalb stellt die Verwendung eines Bioreaktors für die Kultivierung von Knorpelzellen eine weitere interessante Möglichkeit dar. Damit könnte eine Dedifferenzierung von Chondrozyten verhindert werden, da diese ohne Adhäsion im Medium kultiviert werden. Es gibt Anhaltspunkte, dass das Fehlen einer Adhäsion der Knorpelzellen in zweidimensionalen Kulturen in der Amplifizierungsphase die Dedifferenzierung verlangsamen kann [109-111]. Im Gegensatz zu den statischen Zellkultivierungen in Monolayerkulturen erfolgt hier eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und der gleichzeitige Abstrom von Stoffwechselprodukten [112]. Die Arbeitsgruppe um Bücheler [108] entwickelte ein neuartiges Perfusionssystem mit einer laminaren Strömung, einem Gasaustausch und einer mikroskopischen Begutachtung bei andauernder Kultivierung der Knorpelzellen. Nach einer Kulturdauer von 10 Tagen konnte gezeigt werden, dass die Knorpelzellen, die in diesem Perfusionssystem kultiviert wurden, im Gegensatz zu parallel unter statischen Kulturbedingungen untersuchten Knorpelzellen stärker proliferierten und ihre Differenzierung behielten. Ein

weiterer Vorteil von Bioreaktoren im Tissue Engineering liegt in der gleichmäßigen Zellverteilung im Trägermaterial durch den dynamischen Fluss im Zellkulturmedium [113]. Eigene Arbeiten konnten diese homogenere Verteilung in einem Kultursystem mit einer laminaren Strömung bestätigen (Abb. 35). Dafür wurde die einfachste Form eines dynamischen Kultursystems verwendet: eine Spinnerflasche mit einem Magnetrührer. Da es weder zu einem Zustrom von Nährstoffen oder Abfluss von Stoffwechselendprodukten kam, noch Wachstumsfaktoren verwendet wurden, konnte das Problem der Dedifferenzierung zwar nicht gelöst, aber die Formung von 3-D-Strukturen in Form von Makroaggregaten vor Zugabe der Knorpelzellen auf die DBM überflüssig gemacht werden.

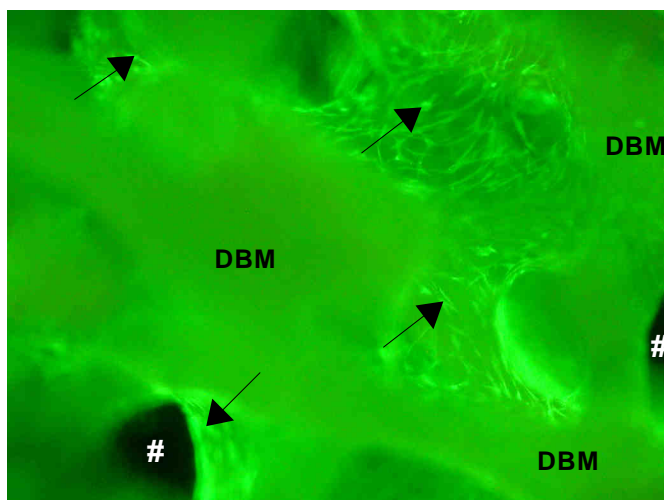


Abb. 35: Dynamische Besiedelung der DBM mit Chondrozyten: Vitalfärbung mit FDA von lang gestreckten Chondrozyten (→), die sich an der Oberfläche und in den Poren (#) der DBM über Fortsätze stark verzweigt aufspannen.
Vergrößerung: 20fach

In der HNO und rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie sind Läsionen durch Tumore oder Traumata oftmals nicht nur auf ein Gewebe beschränkt, sondern neben Knorpel sind in der Regel auch Haut, Schleimhäute, Knochen und Muskel betroffen. Deshalb erscheint es viel versprechend, für den immer bedeutender werdenden Knorpel- und Gewebeersatz, die Möglichkeiten des Tissue Engineerings mit neuen Verfahren der Zellgewinnung zu kombinieren. Aussichtsreich sind hierbei vor allem Stammzell-basierende Therapien, bei denen die Differenzierung zu Chondrozyten aus Stammzellen eingeleitet wird und die anschließende Formung eines Ersatzgewebes auf Biomaterialien, wie z.B. DBM, erfolgt. Denn Stammzellen besitzen nicht nur ausgesprochene Wachstumskapazitäten, sondern auch eine hohe Plastizität und das Potential, auch komplexe Gewebedefekte zu regenerieren [114]. Wenn gleich adulte Stammzellen u.a. in Fettgewebe [115], synovialen und fetalen Membranen [114],

trabekulären Knochen [116] und Knochenmark [117] beschrieben wurden, so macht doch das bisher noch begrenzte Wissen einen klinischen Einsatz für den Knorpelersatz derzeit nicht möglich. Darüber hinaus wird die zukünftige Verwendung von adulten oder embryonalen Stammzellen nicht nur vom wissenschaftlichen Fortschritt, sondern auch von politischen, ethischen und gesellschaftlichen Entscheidungen abhängen [30].

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die DBM für die klinische Anwendbarkeit als Trägermaterial im Tissue Engineering für humane Chondrozyten aufgrund der einfachen Handhabung, der Biodegradierbarkeit, der langjährigen klinischen Erfahrungen im Bereich der Unfallchirurgie und der chondrogenen Wirkung besonders viel versprechend ist. Die vorliegenden in-vitro-Arbeiten und die Ergebnisse publizierter Tierexperimente in vivo belegen darüber hinaus die prinzipielle Eignung des Materials. Vor der Verwendung am Patienten sind jedoch weitere experimentelle Arbeiten notwendig, die dazu dienen sollen, den Einfluss von Wachstumsfaktoren und toxischen Substanzen auf Apoptose und mangelnde Redifferenzierung zu bewerten sowie die Kulturbedingungen, z.B. mit Hilfe eines Bioreaktors, zu optimieren.

5. Zusammenfassung

Traumatische, tumoröse oder kongenitale Läsionen im Bereich des Kopfes erfordern eine Rekonstruktion nicht nur aus funktionellen, sondern auch aus ästhetischen Gesichtspunkten. Das Tissue Engineering ist eine wertvolle Methode, um aus wenigen autologen Zellen mit Hilfe eines Biomaterials größere Gewebestrukturen herzustellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit dem viel versprechenden Biomaterial der humanen demineralisierten Knochenmatrix (DBM), die bereits erfolgreich seit Jahren zur Reparatur von Knochendefekten in der Unfall- und Kieferchirurgie, aber auch Hals-Nasen-Ohrenheilkunde eingesetzt wird. Der Mangel an ausreichenden in-vitro Arbeiten, die die Kultivierung von Knorpelzellen in der DBM genauer untersuchen, machen vor dem tierexperimentellen und klinischen Einsatz weitere in-vitro Arbeiten notwendig.

In dieser Arbeit wurde die Besiedlung der DBM mit humanen Chondrozyten untersucht und die Interaktion der Knorpelzellen mit der DBM in Hinblick auf einen möglichen proliferationshemmenden oder toxischen Effekt der DBM analysiert.

Die einfache Besiedlung von humanen Chondrozyten in der großporigen DBM gelang nur vereinzelt, da es zu einer mangelnden Redifferenzierung und zum Zelltod kam. Deshalb erfolgte eine Besiedlung der DBM mit Chondrozyten-Makroaggregaten. In den histologischen und immunhistochemischen Färbungen konnte die Adhäsion und Proliferation der Chondrozyten-Makroaggregate in der DBM gezeigt werden. Doch im Gegensatz zu den Kontrollknorpelzellen, die nicht mit der DBM in Kontakt kamen, imponierten in der DBM morphologisch veränderte Zellen mit überwiegender Expression von Kollagen I. Die Redifferenzierung mit einer Wiederaufnahme der Expression von Kollagen II konnte nur in geringem Maße nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis des Apoptosemarkers Caspase III in den Zell-DBM-Konstrukten und den Makroaggregaten, die mit dem Medium der DBM kultiviert wurden, legt die Induktion von Apoptose in den Chondrozyten durch die DBM nahe. Unter dem Verdacht auf eine Freisetzung toxischer Substanzen aus der DBM, u.a. von in der Aufarbeitung verwendeter Peressigsäure und Chloroform, wurden Untersuchungen des Zellkulturmediums durchgeführt. Restbestände von Peressigsäure und Chloroform ließen sich mit den verwendeten Detektionssystemen nicht nachweisen.

In einem weiteren Versuchsteil wurde mittels zweier Proliferationstests die Vitalität der Chondrozyten in Abhängigkeit von der Kulturdauer und Konzentration von DBM im Bezug zu einer Gruppe von Kontrollchondrozyten bestimmt. In den ersten 48 Stunden bestand mit steigender Konzentration der DBM ein Trend zu höheren Proliferationsraten und Vitalität der Chondrozyten im Vergleich zur Kontrolle. Nach 96 Stunden sanken die Werte dosisabhängig unter die der Kontrollzellen. Die parallel durchgeführten Vitalfärbungen, mittels der Lebend- (FDA-) und Tot- (PI-) Darstellung stimmen mit den Ergebnissen der Proliferationstests überein.

Der immunhistochemische Nachweis von Caspase III, die sinkende Vitalität nach 96 Stunden im ELISA und die Anzahl an toten Zellen in den Vitalfärbungen sind nicht allein mit der Freisetzung von toxischen Restbeständen aus der DBM erklärbar.

In den Grundlagenarbeiten von Urist et al. (1979) konnte die Freisetzung von chondrogen wirkenden Wachstumsfaktoren aus der DBM gezeigt werden. Der Verbrauch der Wachstumsfaktoren durch die Zellen, der steigende Bedarf durch die starke anfängliche Proliferation und der Wechsel des kompletten CGM alle zwei Tage, könnte nach 48 Stunden zum Entzug von Wachstumsfaktoren, welcher die Einleitung der Apoptose bedingen kann und damit zum immunhistochemischen Nachweis von Caspase III und sinkenden Proliferationsraten im ELISA geführt haben.

Prinzipiell ist DBM als Trägermaterial im Tissue Engineering für humane Chondrozyten geeignet, doch die mangelnde Redifferenzierung und die Einleitung der Apoptose machen sowohl weitere toxikologische Untersuchungen als auch Arbeiten mit dem Einsatz von Wachstumsfaktoren notwendig.

Summary

The reconstruction of traumatic, tumorous or congenital lesions in regions of the head is necessary because of functional and aesthetic reasons. Tissue Engineering is an important method for cultivating some few autologous cells with help of biomaterials. That is why this work examines the hopefulness biomaterial of human demineralized bone matrix (DBM), which has been used for many years for reconstruction of bone in orthopaedic surgery, but also in otorhinolaryngology. For lack of in-vitro studies, analysing the cultivation of chondrocytes in DBM, more in vitro analysis are necessary before application in animal or clinical studies.

In this work the seeding of chondrocytes in the DBM and its interaction with the DBM was tested in view of a possible inhibitory effect of the proliferation or toxicity of the DBM.

The colonisation of human chondrocytes in the large pores of the DBM succeeded only isolated because of missing redifferentiation and cell death. Therefore DBM was populated with macroaggregates of chondrocytes. In the histological and immunohistochemical coloration the proliferation and adhesion of the cell – macroaggregates was shown in the DBM.

In contrast to a control group, cells which were not cultivated with DBM, impressed in the DBM morphological modified cells with expression of collagen I. The redifferentiation with reuptake of expression of collagen II was found in low amounts only. The detection of caspase III, a marker of apoptosis, in the cell-DBM-constructs and in the macroaggregates, cultivating with the medium of DBM, suggested the induction of apoptosis in the chondrocytes by DBM. Because of having the suspicion of the release of toxic agents of the DBM for example peracetic acid or chloroform, explained through the sterilisation process, the cell culture medium was analysed. But neither peracetic acid nor chloroform were verified.

In another experimental setting the vitality of chondrocytes depending on culture time and concentration of DBM was analyzed by two different proliferation tests with reference to a control group. Higher concentration of DBM tended to result in higher proliferation rates and vitality of the cells in contrast to the control group in the first 48 hours. After 96 hours the vitality sank dose-dependent below the control group. The

synchronously performed vitality stain by vital (FDA) and non-vital (PI) coloring corresponded with the results of the proliferation tests.

The detection of Caspase III, the decreasing vitality after 96 hours and the death cells are not only explained by the release of toxic agents of the DBM.

The fundamental works of Urist et al. (1979) have shown the release of growth factors by the DBM, which induces the chondrogenesis. The consumption of growth factors by cells, the increasing need because of the high proliferation rate in the beginning and the complete change of the cell culture medium each two days, could lead to a lack of growth factors after 48 hours, which induced the apoptosis associated with the immunohistochemical detection of Caspase III and decreasing proliferation rates in ELISA analysis.

In principle DBM is qualified as scaffold for Tissue Engineering of human chondrocytes. But the insufficient redifferentiation and the initiation of apoptosis necessitate further toxicological examinations as well as the use of growth factors.

6. Literaturverzeichnis

1. Lanza, R., R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*. Vol. 3. Auflage. 2007: Elsevier Inc. p. 1-9, 707-727.
 2. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-6.
 3. DSO, *Deutsche Stiftung Organtransplantation - Bedarf an Spenderorganen*. 2008.
 4. www.tissue-engineering.net, *NIH Definition of Tissue Engineering/Regenerative Medicine*.
 5. Walgenbach, K.J., et al., *Tissue engineering in plastic reconstructive surgery*. Anat Rec, 2001. 263(4): p. 372-8.
 6. Bucheler, M. and A. Haisch, *Tissue engineering in otorhinolaryngology*. DNA Cell Biol, 2003. 22(9): p. 549-64.
 7. Matesanz, R., B. Miranda, and C. Felipe, *Increasing the number of organ transplants. Professionalisation of organ procurement in Spain has increased donors*. Bmj, 1995. 310(6991): p. 1404.
 8. Fischer-Fröhlich, C.-L., *Die Situation der Organtransplantation in der Bundesrepublik Deutschland und im europäischen Ausland aus medizinischer Sicht - eine Bestandsaufnahme*. Landeszentrale für politische Bildung-Baden-Württemberg, 2007.
 9. Bloomfield, P., et al., *Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses*. N Engl J Med, 1991. 324(9): p. 573-9.
 10. Hammermeister, K.E., et al., *A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease*. N Engl J Med, 1993. 328(18): p. 1289-96.
 11. Baquerizo, A., et al., *Xenoantibody response of patients with severe acute liver failure exposed to porcine antigens following treatment with a bioartificial liver*. Transplant Proc, 1997. 29(1-2): p. 964-5.
 12. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, *Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs*. Nat Med, 1997. 3(3): p. 282-6.
 13. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. 6(3): p. 331-43.
 14. Bell, E., et al., *Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness*. Science, 1981. 211(4486): p. 1052-4.
 15. Burke, J.F., et al., *Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury*. Ann Surg, 1981. 194(4): p. 413-28.
 16. Benya, P.D. and J.D. Shaffer, *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. Cell, 1982. 30(1): p. 215-24.
 17. Rudert, M. and C.J. Wirth, *[Cartilage regeneration and substitution]*. Orthopade, 1998. 27(5): p. W309-21.
 18. Skoog, T., L. Ohlsen, and S.A. Sohn, *Perichondrial potential for cartilagenous regeneration*. Scand J Plast Reconstr Surg, 1972. 6(2): p. 123-5.
-

19. Engkvist, O., et al., *The cartilaginous potential of the perichondrium in rabbit ear and rib. A comparative study in vivo and in vitro.* Scand J Plast Reconstr Surg, 1979. 13(2): p. 275-80.
20. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie.* Vol. 1. Auflage. 2003, München: Urban&Fischer. p.109.
21. Rotter, N., 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): p. 347-56.
22. Brent, B., *Technical advances in ear reconstruction with autogenous rib cartilage grafts: personal experience with 1200 cases.* Plast Reconstr Surg, 1999. 104(2): p. 319-34; discussion 335-8.
23. Staudenmaier, R., *[Optimized auricular reconstruction with autologous cartilage. Experience from 120 cases].* Hno, 2006. 54(10): p. 749-55.
24. Laurie, S.W., et al., *Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone.* Plast Reconstr Surg, 1984. 73(6): p. 933-8.
25. Skouteris, C.A. and G.C. Sotereanos, *Donor site morbidity following harvesting of autogenous rib grafts.* J Oral Maxillofac Surg, 1989. 47(8): p. 808-12.
26. Haisch, A., et al., *A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2002. 259(6): p. 316-21.
27. Ting, V., et al., *In vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes.* Ann Plast Surg, 1998. 40(4): p. 413-20; discussion 420-1.
28. von der Mark, K., et al., *Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.* Nature, 1977. 267(5611): p. 531-2.
29. Aulhouse, A.L., et al., *Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro.* In Vitro Cell Dev Biol, 1989. 25(7): p. 659-68.
30. Rotter, N., et al., *Cartilage tissue engineering using resorbable scaffolds.* J Tissue Eng Regen Med, 2007. 1(6): p. 411-6.
31. Hutmacher, D.W., J.C. Goh, and S.H. Teoh, *An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications.* Ann Acad Med Singapore, 2001. 30(2): p. 183-91.
32. Buschmann, M.D., et al., *Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix.* J Orthop Res, 1992. 10(6): p. 745-58.
33. Bruns, J., *Tissue Engineering - Neues zum Gewebeersatz im Muskel-Skelett-System.* 2003, Darmstadt: Steinkopff Verlag. 16-17,100-101.
34. Sittering, M., et al., *Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes.* J Biomed Mater Res, 1996. 33(2): p. 57-63.
35. Bujia, J., et al., *Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture.* Acta Otolaryngol, 1995. 115(2): p. 307-10.
36. Cui, Y.L., et al., *Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro.* Biomaterials, 2003. 24(21): p. 3859-68.
37. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.* Biomaterials, 2000. 21(24): p. 2529-43.
38. Temenoff, J.S. and A.G. Mikos, *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage.* Biomaterials, 2000. 21(5): p. 431-40.

-
39. Athanasiou, K.A., et al., *Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers*. Arthroscopy, 1998. 14(7): p. 726-37.
 40. Marcacci, M., et al., *Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results*. Clin Orthop Relat Res, 2005(435): p. 96-105.
 41. Gerard, C., et al., *The effect of alginate, hyaluronate and hyaluronate derivatives biomaterials on synthesis of non-articular chondrocyte extracellular matrix*. J Mater Sci Mater Med, 2005. 16(6): p. 541-51.
 42. Homminga, G.N., et al., *Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro*. Acta Orthop Scand, 1993. 64(4): p. 441-5.
 43. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. 331(14): p. 889-95.
 44. Haisch, A., et al., *[Tissue engineering of human cartilage tissue for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin gel and polymer carriers]*. Hno, 1996. 44(11): p. 624-9.
 45. Kamil, S.H., et al., *In vitro tissue engineering to generate a human-sized auricle and nasal tip*. Laryngoscope, 2003. 113(1): p. 90-4.
 46. Haisch, A., et al., *Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2004. 261(4): p. 216-24.
 47. Haisch, A., et al., *Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering*. Med Biol Eng Comput, 2000. 38(6): p. 686-9.
 48. Haisch, A., et al., *Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation*. Biomaterials, 2000. 21(15): p. 1561-6.
 49. Haisch, A., et al., *Creating artificial perichondrium by polymer complex membrane macroencapsulation: immune protection and stabilization of subcutaneously transplanted tissue-engineered cartilage*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2005. 262(4): p. 338-44.
 50. Duda, G.N., et al., *Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo*. J Biomed Mater Res, 2000. 53(6): p. 673-7.
 51. Haisch, A., et al., *The morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue-engineered human septal cartilage*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2005. 262(12): p. 993-7.
 52. Shieh, S.J., S. Terada, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies*. Biomaterials, 2004. 25(9): p. 1545-57.
 53. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. 150(698): p. 893-9.
 54. Glowacki, J., et al., *Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects*. Lancet, 1981. 1(8227): p. 959-62.
 55. Glowacki, J. and J.B. Mulliken, *Demineralized bone implants*. Clin Plast Surg, 1985. 12(2): p. 233-41.
 56. Hoffer, M.J., et al., *Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs*. Vet Surg, 2008. 37(7): p. 639-47.
 57. Leatherman, B.D. and J.L. Dornhoffer, *The use of demineralized bone matrix for mastoid cavity obliteration*. Otol Neurotol, 2004. 25(1): p. 22-5; discussion 25-6.
 58. Kuhls, R., et al., *Human demineralised bone matrix as a bone substitute for reconstruction of cystic defects of the lower jaw*. Cell Tissue Bank, 2001. 2(3): p. 143-53.
 59. Jerosch, J., et al., *[Bone banks in the FRG. Results of a survey]*. Unfallchirurg, 1990. 93(7): p. 334-8.
-

-
60. Urist, M.R., et al., *Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. 70(12): p. 3511-5.
 61. Marczynski, W., D. Tylman, and J. Komender, *Long-term follow up after transplantation of frozen and radiation sterilized bone grafts*. Ann Transplant, 1997. 2(1): p. 64-6.
 62. Hofmann, C., T. von Garrel, and L. Gotzen, [*Bone bank management using a thermal disinfection system (Lobator SD-1). A critical analysis*]. Unfallchirurg, 1996. 99(7): p. 498-508.
 63. Pruss, A., et al., *Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants--a reliable sterilization method*. Ann Transplant, 2003. 8(2): p. 34-42.
 64. Pruss, A., et al., *Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol*. Biologicals, 2001. 29(2): p. 59-66.
 65. Urist, M.R. and A.J. Mikulski, *A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent*. Proc Soc Exp Biol Med, 1979. 162(1): p. 48-53.
 66. Dieudonne, S.C., et al., *Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments*. J Bone Miner Res, 1994. 9(6): p. 771-80.
 67. Iwasaki, M., et al., *Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells*. Endocrinology, 1993. 132(4): p. 1603-8.
 68. Maor, G., Z. Hochberg, and M. Silbermann, *Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles*. Acta Endocrinol (Copenh), 1993. 128(1): p. 56-64.
 69. Zhou, S., et al., *Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human marrow stromal cells cultured in collagen sponges*. Cell Tissue Bank, 2005. 6(1): p. 33-44.
 70. ten Koppel, P.G., et al., *Efficacy of perichondrium and a trabecular demineralized bone matrix for generating cartilage*. Plast Reconstr Surg, 1998. 102(6): p. 2012-20; discussion 2021.
 71. van Osch, G.J., et al., *The role of trabecular demineralized bone in combination with perichondrium in the generation of cartilage grafts*. Biomaterials, 1999. 20(3): p. 233-40.
 72. Bean, J.K., et al., *Reconstruction of the growing cricoid with a composite graft of demineralized bovine bone and autogenous perichondrium; a comparative study in rabbits*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 1993. 25(1-3): p. 163-72.
 73. ten Koppel, P.G., et al., *A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the 'rabbit pinna punch-hole' model*. Biomaterials, 2001. 22(11): p. 1407-14.
 74. Verwoerd-Verhoef, H.L., et al., *Induction in vivo of cartilage grafts for craniofacial reconstruction*. Am J Rhinol, 1998. 12(1): p. 27-31.
 75. Pirsig, W., et al., *Cartilage transformation in a composite graft of demineralized bovine bone matrix and ear perichondrium used in a child for the reconstruction of the nasal septum*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 1995. 32(2): p. 171-81.
 76. Abdullah, B., et al., *The microscopic biological response of human chondrocytes to bovine bone scaffold*. Cell Tissue Bank, 2008.
 77. Rudert, M., F. Hirschmann, and C.J. Wirth, [*Growth behavior of chondrocytes on various biomaterials*]. Orthopade, 1999. 28(1): p. 68-75.
-

-
78. Ishizaki, Y., J.F. Burne, and M.C. Raff, *Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture*. J Cell Biol, 1994. 126(4): p. 1069-77.
 79. Tschan, T., et al., *Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites*. J Cell Biol, 1990. 111(1): p. 257-60.
 80. Freed, L.E., I. Martin, and G. Vunjak-Novakovic, *Frontiers in tissue engineering. In vitro modulation of chondrogenesis*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S46-58.
 81. Wang, J.C., et al., *Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material*. Spine, 2001. 26(13): p. 1429-35; discussion 1435-6.
 82. Jager, M., et al., *Extensive H(+) release by bone substitutes affects biocompatibility in vitro testing*. J Biomed Mater Res A, 2006. 76(2): p. 310-22.
 83. Ziran, B.H., W.R. Smith, and S.J. Morgan, *Use of calcium-based demineralized bone matrix/allograft for nonunions and posttraumatic reconstruction of the appendicular skeleton: preliminary results and complications*. J Trauma, 2007. 63(6): p. 1324-8.
 84. Lomas, R.J., et al., *An evaluation of the capacity of differently prepared demineralised bone matrices (DBM) and toxic residuals of ethylene oxide (EtOx) to provoke an inflammatory response in vitro*. Biomaterials, 2001. 22(9): p. 913-21.
 85. Sittering, M., et al., *Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques*. Biomaterials, 1996. 17(3): p. 237-42.
 86. Meryman, H.T., *Cryoprotective agents*. Cryobiology, 1971. 8(2): p. 173-83.
 87. Romeis, B., *Mikroskopische Technik*. Vol. 17. Auflage. 1989, München: P. Böck. Urban & Schwarzenberg. S.230-236; 443.
 88. Naumann, A., et al., *Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system*. Tissue Eng, 2004. 10(11-12): p. 1695-706.
 89. Horn, F., et al., *Biochemie des Menschen*. 2003, Thieme: Stuttgart. p. p. 268-270.
 90. Oberholzer, M.J., *Pathologie verstehen - Molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie*. Vol. 1. Auflage. 2001, Stuttgart - New York: Thieme. 24,263.
 91. Yeh, E.T., *Life and death of the cell*. Hosp Pract (Minneap), 1998. 33(8): p. 85-7, 91-2.
 92. Lopez, C., et al., *Determination of viability of human cartilage allografts by a rapid and quantitative method not requiring cartilage digestion*. Cell Transplant, 2008. 17(7): p. 859-64.
 93. Rotter, N., et al., *Age dependence of biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered human septal cartilage*. Biomaterials, 2002. 23(15): p. 3087-94.
 94. Holtzer, H., et al., *The Loss Of Phenotypic Traits By Differentiated Cells In Vitro, I. Dedifferentiation Of Cartilage Cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1960. 46(12): p. 1533-42.
 95. Abbott, J. and H. Holtzer, *The loss of phenotypic traits by differentiated cells. 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures*. J Cell Biol, 1966. 28(3): p. 473-87.
-

-
96. Schulze, M., K.E. Kuettner, and A.A. Cole, [*Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models*]. *Orthopade*, 2000. 29(2): p. 100-6.
 97. van Osch, G.J., S.W. van der Veen, and H.L. Verwoerd-Verhoef, *In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction*. *Plast Reconstr Surg*, 2001. 107(2): p. 433-40.
 98. BGIA, *Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung - GESTIS-Stoffdatenbank*.
<http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0>, 2008.
 99. Jäckel, M., *Die genetische Kontrolle des programmierten Zelltods (Apoptose)*. Springer-Verlag, HNO · 46:614–625, 1998.
 100. Martin, I., et al., *Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation*. *J Cell Biochem*, 2001. 83(1): p. 121-8.
 101. Bessho, K., T. Tagawa, and M. Murata, *Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction*. *J Oral Maxillofac Surg*, 1990. 48(2): p. 162-9.
 102. Miot, S., et al., *Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition*. *Biomaterials*, 2005. 26(15): p. 2479-89.
 103. Richmon, J.D., et al., *Effect of growth factors on cell proliferation, matrix deposition, and morphology of human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer*. *Laryngoscope*, 2005. 115(9): p. 1553-60.
 104. Gao, J., et al., *Osteochondral defect repair by demineralized cortical bone matrix*. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(427 Suppl): p. S62-6.
 105. Urist, M.R., *Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development*. *J Bone Miner Res*, 1997. 12(3): p. 343-6.
 106. Urist, M.R., et al., *Endogenous bone morphogenetic protein: immunohistochemical localization in repair of a punch hole in the rabbit's ear*. *Plast Reconstr Surg*, 1997. 99(5): p. 1382-9.
 107. Alexander, T.H., et al., *Human serum for tissue engineering of human nasal septal cartilage*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006. 135(3): p. 397-403.
 108. Bucheler, M., et al., [*Proliferation and differentiation of human osteoblasts from the nasal septum in a new perfusion culture system*]. *Hno*, 2008. 56(3): p. 301-5.
 109. Vunjak-Novakovic, G., et al., *Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage*. *J Orthop Res*, 1999. 17(1): p. 130-8.
 110. Obradovic, B., et al., *Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage*. *Biotechnol Bioeng*, 1999. 63(2): p. 197-205.
 111. Wu, F., et al., *Bioreactor development for tissue-engineered cartilage*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. 875: p. 405-11.
 112. Haisch, A., [*Bioreactors in tissue culture*]. *Hno*, 2008. 56(4): p. 373-5.
 113. Bancroft, G.N., et al., *Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(20): p. 12600-5.
 114. Ringe, J., et al., *Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. 2(2-3): p. 136-46.
 115. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. 7(2): p. 211-28.
-

-
116. Noth, U., et al., *Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells*. J Orthop Res, 2002. 20(5): p. 1060-9.
 117. Reyes, M., et al., *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow*. J Clin Invest, 2002. 109(3): p. 337-46.
-

7. Danksagung

Für die langjährige Betreuung und die Anleitung meiner Arbeit in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde / Kopf-Hals-Chirurgie möchte ich mich herzlich bei PD. Dr. A. Haisch und Dr. K. Stölzel bedanken. Sowohl die Bereitstellung des vorliegenden spannenden Forschungsthemas als auch die zahlreichen interessanten Gespräche haben mein Interesse an der Wissenschaft weiter verstärkt.

Für die Bereitstellung der demineralisierten Knochenmatrix und die freundliche Beantwortung von vielen Fragen bedanke ich mich herzlich bei dem Team von Prof. Dr. A. Pruss und insbesondere bei Herrn S. Schurig.

Ebenso gilt mein Dank den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern, vor allem U. Marzahn, durch deren Hilfe so manche Hürde der Laborarbeit genommen werden konnte.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. H. Prüß, der mir wissenschaftlich mit Rat und Tat jederzeit zur Seite gestanden hat.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich auf diesem Weg begleitet hat, meinen Enthusiasmus stets unterstützte und durch Motivation und Rückhalt den nötigen Raum für mein Arbeiten gab.

8. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Juliane Liese, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Humane demineralisierte Knochenmatrix (DBM) im Tissue Engineering von humanem Knorpelgewebe“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Nuthetal, den 22.04.2009

Juliane Liese

9. Lebenslauf

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

10. Publikation

Abstract und Poster

Liese J., Stölzel K., Holleck-Weithmann S., et al. Einsatz von demineralisierter humaner Knochenmatrix (DBM) als Trägermaterial im Tissue Engineering von humanen Knorpelgeweben. GerMedSci, 2009: 641