

---

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Verwendete Biomaterialien

---

#### 2.1.1 Polymervlies

Bei den in dieser Studie verwendeten biodegradierbaren Polymervliesen (Ethisorb 210<sup>®</sup>, Ethicon<sup>®</sup>, Norderstedt, Deutschland) handelt es sich um Kopolyester aus 90% Glykolat und 10% Laktat [62]. Die Fasern messen ca. 25 µm im Durchmesser, und liegen in einer gebündelten, ungewobenen, chaotischen Struktur vor (Abb. 1).

Die Formel ist:  $-[O-CH_2-CO]_n-PGLA$ . Um einen besseren Gewebeverbund zu gewährleisten, sind die Fasern punktuell mit Polydioxanon-Klebestellen verbunden. Die steril verpackten Vliese wurden für die verschiedenen Versuchsreihen in entsprechender Form und Größe vom Hersteller angefertigt (Tabelle 1).

#### 2.1.2 Fibrin

Zur dreidimensionalen Anordnung und örtlichen Fixierung der Zellen in den Vliesen und auf den Biomaterialträgern wurde ein Zweikomponenten-Fibrinkleber (Tissucol Duo S<sup>®</sup> Immuno, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) eingesetzt. Er besteht aus zwei tiefgefrorenen Lösungen in einer Fertigspritze (Tabelle 2). Die Fibrinogenkomponente wurde mit der Zellsuspension im Verhältnis 1:3 verdünnt, die Thrombinkomponente wurde mit Nährmedium II (Tabelle 3) im Verhältnis 1:10 verdünnt.

#### 2.1.3 Trägermaterialien

##### 2.1.3.1 Kalziumkarbonate

Es wurden zwei Kalziumkarbonate unterschiedlicher Kristallstruktur verwendet. Zum einen ein poröser Aragonit, zum anderen ein Kalzit ohne Poren.

Das natürliche Trägermaterial  $[CaCO_3]$  in der Kristallstruktur Aragonit (Biocoral<sup>®</sup>, Inotek Co., St. Gonery, Frankreich), stammt von der Korallen-Spezies *Porites* vom Great Barrier Reef in Neukaledonien. Es handelt sich dabei um Zylinder mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Höhe von 8 mm. Nach Angaben des Herstellers wurden die Proben durch eine Behandlung mit Natriumhypochlorit von Proteinen befreit und mit Aqua dest. gespült, um Reste organischer Bestandteile der Korallen zu

entfernen. Die Sterilisation erfolgte mit 2,5 Mrad durch Gammabestrahlung. Biocoral® besteht neben Aminosäuren und Spurenelementen zu mind. 97% aus Aragonit (Tabelle 4). 45 % des Materialvolumens wird durch Makro- und Mikroporen gebildet. Der Durchmesser der interkonnektierenden Makroporen beträgt 150 – 400 µm (Mittelwert 250 µm) (Abb. 2a), der der Mikroporen unter 1µm (Abb. 2b) [43]. Bei einem spezifischen Gewicht von 1,35 ergibt sich eine Oberfläche von >1 m<sup>2</sup>/g Biocoral® [63].

Das synthetische Trägermaterial [CaCO<sub>3</sub>], in der Kristallstruktur Kalzit, wurde von Dr. G. Berger, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, hergestellt. Es handelt sich dabei um ein Kalziumkarbonat mit Phosphoranteilen in soliden Quadern der Kantenlängen 10 mm x 10 mm x 5 mm (Abb. 3).

#### 2.1.3.2 Zemente als abbindende Materialien

Es wurden drei verschiedene Zemente eingesetzt: Ein Gemisch aus Kalziumsulfat (Gips) und Trikalziumphosphat (TCP), und zwei verschiedene Kalziumphosphatzemente.

Gebranntes Kalziumsulfat-Hemihydrat [ $CaSO_4 \cdot 0,5H_2O$ ] (Korngröße ~6,89 µm) (Merck®, Darmstadt, Deutschland) und TCP [ $Ca(PO_4)_2$ ] (Korngröße 50 – 125 µm) (Merck®, Darmstadt, Deutschland) wurden im Gewichtsverhältnis 80:20 miteinander vermengt. Für die Herstellung der Implantate wurde das Gemisch mit Aqua dest. zu einer Paste verarbeitet, die anschließend in quaderförmige 10 mm x 10 mm x 6 mm bzw. zylindrische (Durchmesser = 4 mm, Höhe = 8 mm) Formen gegossen wurde. Nach dem Aufdrücken und Einwalken der entsprechenden Polymervliese in die Oberfläche des Gemisches und beginnender Aushärtung (10 min.) wurden die Implantate vorsichtig aus den Gussformen herausgedrückt (Abb. 4) und mit einer Gesamtdosis von 25 KGy sterilisiert. Dann wurden die Probekörper mit einer Fibrinogen-Zellsuspension beimpft.

Als ein Kalziumphosphatzement (KPZ I) wurde handelsübliches Biobon® der Packungsgröße 2,5 g und 5 g verwendet [64]. Die feste Phase des Biobons wird in einem kleinen Ballon geliefert, in den die flüssige Phase (0,9 % Kochsalzlösung) mit Hilfe einer Spritze eingebracht wird. Die flüssige Phase wurde für die Transplantat-

herstellung in diesem Versuch nach Absprache mit dem Hersteller um 20 % gegenüber dem vorgeschrieben Mischungsverhältnis erhöht, um das Abbindeintervall zu verlängern. Nach Durchkneten des Ballons für 60 Sekunden wurde die entstandene Paste als Trägermaterial in quaderförmige 10 mm x 10 mm x 6 mm Formen gegossen. Es folgte das Aufdrücken und Einwalken der Polymervliese (Tabelle 1) in die Oberfläche des Trägermaterials. Die für 10 min. bei 37 °C in feuchtem Milieu ausgehärteten Implantate wurden vorsichtig aus den Gussformen herausgedrückt (Abb. 4,5) und mit der Fibrinogen-Zellsuspension beimpft.

Bei dem anderen Kalziumphosphatzement (KPZ II) handelte es sich um handelsübliche Norian SRS<sup>®</sup>-Chargen der Packungsgröße 5 cm<sup>3</sup> und 10 cm<sup>3</sup> [65]. Feste und flüssige Phase des Zementes wurden nach Anleitung in einem autoklavierten Handmörser vermennt und zu einer Paste verarbeitet. Das weitere Procedere erfolgte wie bei KPZ I (Abb. 4,5).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Knorpelpräparation / Chondrozytenisolation

Die gesamte Knorpelpräparation fand unter der Laminar-Air-Flow statt. Bei der Präparation wurde steril gearbeitet: Gelenke en bloc von Rindern wurden vom Schlachthof zu Verfügung gestellt. Wenige Stunden post mortem wurden die Gelenkköpfe der Rinderknochen mit Ethanol (70 %) abgewischt. Mit Hilfe eines sterilen Skalpells wurden Knorpelstücke von den Gelenkflächen abgeschält (Abb. 6a) und in einem 50 ml Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen mit ca. 30 ml Nährmedium I (Tabelle 3) und einer Messerspitze Nystatin aufgefangen. Nach dem Abpipettieren des Mediums erfolgte für 20 sec. die Spülung der Knorpelstücke in Ethanol (70 %). Anschließend wurde gründlich mit Nährmedium I nachgespült. Die Knorpelstücke wurden dann mit Hilfe zweier Skalpelle in einer Petrischale zu 1 mm<sup>3</sup> Stücken zerkleinert.

Für 12-18 h erfolgte die Isolierung der Chondrozyten des so vorbereiteten Knorpelmaterials mit Hilfe eines Enzymcocktails (Kollagenase II, Kollagenase P und Hyaluronidase) in 25 ml Nährmedium I in einer Spinnerflasche (Abb. 6b,c) im Brutschrank (36,8 °C bei 5,5 % CO<sub>2</sub>) unter ständigem Rühren (Magnetstab) bei leicht geöffneter Seitenverschlusskappe zur Belüftung.

Zur Trennung von Zellen und Matrixresten wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gefiltert und anschließend bei Raumtemperatur mit 1800 U/min. 7 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet anschließend wieder in Nährmedium I suspendiert, um erneut zentrifugiert zu werden. Dieser Waschvorgang erfolgte mehrfach bis der Überstand vollständig klar war (2-3maliges Waschen). An die Resuspension des Pellets in 10 ml Nährmedium I schloss sich die Vitalitätsbestimmung an: In einem Eppendorfgefäß wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension gründlich durchmischt und vitale (keine Zytoplasmaanfärbung) und avitale Zellen (blaues Zytoplasma) in einer Neubauer-Zellzählkammer ausgezählt.

### 2.2.2 Monolayerkultur

Die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen ausgesät, wobei je nach Zellzahl in 800 ml Flaschen 5-6 x 10<sup>6</sup> Zellen und in 275 ml Flaschen 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen pipettiert wurden. Nach dem Auffüllen mit Nährmedium I wurden die Zellen im Brutschrank (36,8 °C bei 5,5 % CO<sub>2</sub>) belüftet kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel unter mikroskopischer Kontrolle des sich bildenden Zellrasens (Abb. 6d). Dazu wurde mit einer Pipette vorsichtig das Medium mit den nicht adherierenden, avitalen Zellen abgesaugt und frisches Medium einpipettiert. Nach 4-5 Tagen waren die Zellen konfluent – d.h. die Zellen lagen dicht an dicht und mussten passagiert werden um einer Ausbildung von Zellkonglomeraten entgegenzuwirken.

### 2.2.3 Passage

Nach dem Abgießen des Nährmediums aus der Kulturflasche wurde diese mit 5-10 ml PBS-Puffer ausgespült. Auf die Verteilung von 2-4 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) über den vorhandenen Zellrasen folgte die Inkubation im Brutschrank (5 min.). Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde die Ablösung der Zellen durch behutsames an die Tischkante Klopfen mechanisch unterstützt. Nach ausreichender Lösung der Zellen vom Boden erfolgte ein sofortiger Abbruch der Trypsinierung durch rasche Zugabe von 20 ml des Nährmediums I. Mittels einer Pipette wurde die Suspension homogenisiert und bei 1800 U/min. für 7 min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet erneut suspendiert. Diese Prozedur wurde wiederholt, das Pellet in 10 ml Medium zum Auszählen der Zellen (Neubauer-Hämatozytometer nach Trypanblau-Färbung) suspendiert, um daraufhin erneut ausgesät zu werden (s.o.). Nach drei Passagen wurden die Zellen für die Implantatbeimpfung verwendet.

### 2.2.4 Herstellung der Biphasen (Kalziumkarbonate)

Die in Monolayerkultur vervielfältigten Chondrozyten wurden in einer Konzentration von  $25\text{-}30 \times 10^6$  Zellen/ml Nährmedium II im Verhältnis 3:1 mit Fibrinogen versetzt. Die Polymervliese wurden in Sechs-Loch-„Multiwell“-Zellkulturplatten (Falcon®) mehrmals mit der Fibrinogen-Zellsuspension überpipettiert. Das Volumen der Suspension war etwas größer als das der Vliese. Die Vliese wurden ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur getränkt. Ein mit Fibrinogen-Zellsuspension durchtränktes Vlies wurde nun aus der Sechs-Loch-Zellkulturplatte entnommen und auf Biomaterialträger aufgebracht. Anschließend erfolgte sowohl die dreidimensionale Fixierung der Zellen als auch die Umkapselung von Polymervlies und Biomaterialträger als Biphasen mit 1:10 verdünntem Thrombin/Nährmedium II (Abb. 7). In Vorversuchen wurden biphasische Implantate ohne Verwendung von Polymervliesen hergestellt und kultiviert. Die Fibrinogen-Zellsuspension wurde direkt auf das Trägermaterial gegeben und mit Thrombin fixiert (s.o.).

#### 2.2.4.1 Aragonit (Biocoral®)

Ein Teil der mit Zellen beimpften Transplantate wurde für die Zeit der Perfusionskultur in passgenaue Glasröhrchen eingebracht. Eine Versorgung der Zellen erfolgte so ausschließlich von der Stirnseite bzw. von der Basis der Transplantate (Abb. 8). Der Einfluss dieser abgewandelten Versorgungstechnik auf Vitalität der Zellen, Matrixsynthese und Zellverteilung sollte damit untersucht werden.

#### 2.2.4.2 Kalzit

Die Mediumversorgung erfolgte ausschließlich durch kontinuierliches Umspülen der in die Kulturkammer eingebrachten Transplantate.

### 2.2.5 Herstellung der Biphasen (abbindende Materialien)

Grundsätzlich wird eine pulverisierte feste Phase mit einer flüssigen Phase vermischt. Es ergibt sich eine Paste, die nach einer für das Material und Mischungsverhältnis typischen Abbindezeit aushärtet. Eingebracht in eine Gussform können in dieser Zeit Vliesfasern von der Paste umflossen und in den Zement inkorporiert werden (Abb. 4,5). Nach dem Aushärten des so entstandenen Trägermaterials wurden diese Biphasen (Abb. 5a) (Einzelheiten s. Trägermaterialien) mit vitalen Zellen versehen (Abb. 9).

Die Implantate (Trägermaterial und Polymervlies) wurden in einer Sechs-Loch-Zellkulturplatte mehrmals mit der Fibrinogen-Zellsuspension (s. 2.2.4) überpipettiert. Das Volumen der Suspension war auch hier etwas größer als das der Vliese. Die auf den Trägermaterialien befindlichen Vliese wurden auf diese Art und Weise ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur getränkt. Mit 1:10 verdünntem Thrombin erfolgte anschließend die Fixierung der Chondrozyten in dem mit dem gegossenen Träger fest verbundenen Polymervlies (Abb. 5,9,10a).

### **2.2.6 Vorbereitung des Perfusionssystems**

Die gereinigte Minuthkammer wurde mit Hilfe eines Metallclips verschlossen (Abb. 10b). Zu- und Ablauf der Kammer (Abb. 11a) wurden über Silikonschläuche mit Mediumflaschen verbunden. Für den Zulauf wurde ein Schlauch mit 0,2 mm Innendurchmesser und spezieller Einhängvorrichtung für die Kassetten-Peristaltikpumpe verwendet. Die zur Belüftung der Mediumflaschen zusätzlichen Öffnungen in den Schraubverschlüssen wurden mit Sterilfiltern (Porengröße: 0,4 µm) verschlossen (Abb. 11b). Das gesamte System wurde anschließend 20 Minuten bei 135 °C autoklaviert.

### **2.2.7 Kultivierung der Biphasen**

Bei 37° C wurden die mit Zellen bestückten Biphasen in Minuth-Kulturkammern (Abb. 10b,11) inkubiert und in Intervallen kontinuierlich während der gesamten Kulturzeit mit Nährmedium I umspült [66]. Die Pumpe wurde dabei in 30-minütigen Ein-/Aus-Intervallen bei einer Förderleistung von 1 ml/h geschaltet.

### **2.2.8 Histologie**

#### **2.2.8.1 Lichtmikroskopie**

Die direkt aus der Kulturkammer entnommenen Transplantate wurden zunächst in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) gespült und anschließend in Formaldehyd (7 %, 4 °C) (Tabelle 11) fixiert.

#### **2.2.8.1.1 Anfertigung der Sägeschnitte**

Nach Aushärtung (vollständiger Polymerisation) des MMAs wurden die Glasröhrchen zerschlagen. Mit einer Handsäge wurden die Präparate von überstehendem PMMA befreit. Die zurechtgestutzten Blöcke wurden schnittgerecht (Schnittführung senk-

recht zum Interface) mit Hilfe eines Zweikomponenten-Klebers auf Präparatetellern befestigt. Nach einem primären Anschnitt wurde jeweils vor dem Sägevorgang ein Kunststoffobjekträger mit einem Einkomponenten-Sofortbindemittel (Cyanacrylat, Instantbond GmbH, Berlin, Deutschland) auf den in der Innenlochsäge eingespannten Präparateblock geklebt. Die Präparate wurden mit dem diamantierten Innenlochsägemikrotom (Leitz-Wetzlar Typ 1600<sup>®</sup>, Wetzlar, Deutschland, Sägeblattdicke = 300 µm) vollständig aufgesägt, so dass durchschnittlich 8 bis 12 Schnitte (Schnittdicke = 50 µm) pro Präparateblock (je nach Größe) angefertigt werden konnten. Anschließend wurde die Oberfläche des Präparates mit Hilfe eines Rotationsschleifgerätes (Exakt, Oststeinbek, Deutschland) zunächst grob mit 2000er Körnung und dann spiegelnd plan mit 4000er Körnung geschliffen. Die Schnittdicke betrug dann im Durchschnitt 30 µm.

#### 2.2.8.1.2 Methylmetacrylat (MMA)-Einbettung

Die MMA-Einbettung ist der Tabelle 5 zu entnehmen. (Reagenzien: s. Tabelle 11)

#### 2.2.8.1.3 Färbungen

Von jedem Präparat wurden mindestens jeweils zwei Schnitte pro Färbung (s.u.) angefertigt. Die Giemsa und von Kossa / Paragon Färbungen wurden als Oberflächenfärbung nach Gross und Strunz durchgeführt [67]. (Reagenzien: s. Tabelle 11)

##### 2.2.8.1.3.1 Färbung nach Giemsa (Übersichtsfärbung)

Die Färbeprozedur ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Nach Giemsa färbt sich Knorpelmatrix rotviolett, mineralisierte Matrix erscheint rosa bis zartrosa, Kollagen und Osteoid blassblau.

##### 2.2.8.1.3.2 Färbung nach Alzianblau / PAS

Die Färbeprozedur ist der Tabelle 7 zu entnehmen. Alzianblau färbt saure Mukosubstanzen leuchtend blau. Die Gegenfärbung mit Hilfe der Perjodsäure-Schiff Reaktion (PAS) führt zu einer Rotfärbung von Polysacchariden und neutralen Mukosubstanzen. Die Kernfärbung erfolgt mit *Mayers Hämalaun*.

##### 2.2.8.1.3.3 Färbung nach v. Kossa / Paragon

Die Färbeprozedur ist der Tabelle 8 zu entnehmen. Die Methode nach v. Kossa (1901) ist zur Untersuchung von kalkhaltigem Gewebe geeignet. Kalzium in Karbo-

naten und Phosphaten wird gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Kalkhaltige Areale werden so braunschwarz markiert [68]. Die Gegenfärbung nach Paragon führt zu einer rosa bis roten Darstellung des Weichgewebes durch die Fuchsin-Komponente und das Toluidinblau, während sich mineralisiertes Hartgewebe, ergänzend zur kontrastreichen v. Kossa Darstellung, zartrosa bis purpurrot [68] anfärbt.

### 2.2.8.2 Elektronenmikroskopie

#### 2.2.8.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das Untersuchungsareal wurde auf Interface und Knorpelphase beschränkt. Die Aufarbeitung und Kontrastierung der Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie wurde nach Müller-Mai et al. durchgeführt [43]. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 9 aufgeführt (Reagenzien: s. Tabelle 11). Auf einem Ultramikrotom (Ultra-cut E, Reichert Jung, Deutschland) wurden mit einem Diamantmesser (Diatome<sup>®</sup> MA 780) Ultradünnschnitte angefertigt (Schnittdicke = 80 nm). Die Schnitte wurden in Aqua dest. aufgefangen und auf Formvar<sup>®</sup>-befilmte Kupfernetze aufgebracht. Anschließend wurden sie mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 410, Philips Electronics, Eindhoven, Niederlande) ausgewertet.

#### 2.2.8.2.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Aufarbeitung der Präparate wurde nach Müller-Mai [69] durchgeführt. Einzelne Schritte sind aus Tabelle 10 ersichtlich (Reagenzien: s. Tabelle 11). Mit Hilfe eines Sputter-Coaters (Emscope Typ SC 500, USA) wurden die Präparate im Hochvakuum ( $10^{-5}$  Torr) mit einer Gold-Palladium-Schicht bedampft (Schichtdicke ca. 400 Å) und anschließend mit einem Rasterelektronenmikroskop ausgewertet (SEM 505, Philips Electronics, Eindhoven, Niederlande).

### 2.2.9 Kristallographische Röntgenanalyse

Die kristallographischen Röntgenanalysen wurden an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin durchgeführt. Durch Bestrahlung der Materialien mit kurzwelliger Röntgenstrahlung kann deren Ablenkung (Röntgenbeugung) gemessen werden. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ist mit den Gitterabständen im Kristall vergleichbar. Das Kristallgitter wirkt dabei als mehrdimensionales optisches Gitter. Um Unterschiede der kristallinen Struktur feststellen zu können

wurden die Ausgangsmaterialien der beiden Kalziumphosphatzemente (Norian SRS<sup>®</sup>, Biobon<sup>®</sup>) und im Vergleich dazu der Kalziumkarbonat Aragonit (Biocoral<sup>®</sup>) einer solchen Analyse unterzogen. Ausgehärteter KPZ I wurde im Schüttelbad bei 37 °C in Simulated Body Fluid (SBF) behandelt um chemische Strukturveränderungen im Verlauf nachzuweisen. Eine kristallographische Röntgenanalyse wurde nach 24 h und 28 Tagen unter oben genannten Konditionen durchgeführt.

#### **2.2.10 pH-Bestimmung Mediumablauf KPZ I vs. KPZ II**

Bei der Herausnahme der Biphasen der Kalziumphosphatzement-Gruppe wurde jeweils eine pH-Messung des im Ablauf befindlichen Mediums durchgeführt. Dazu wurden die Verbindungsschläuche zur Auffangflasche hin dekonnektiert und das Medium im Lumen der Schläuche zur Messung in einem Reagenzglas aufgefangen. Insgesamt wurden 24 Messungen (Perfusionskulturen) pro Trägermaterial durchgeführt.