

Aus dem Centrum 16 für Audiologie / Phoniatrie, Augen- und HNO-Heilkunde  
Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Hans Scherer

HABILITATIONSSCHRIFT

**In vitro präformierte Knorpelgewebe in der plastisch-  
rekonstruktiven Kopf- und Halschirurgie**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Andreas Haisch  
geboren am 12.06.1965 in Stuttgart

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht im: März 2007

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Bloching/Homburg/Saar  
2. Prof. Dr. W. Minuth/Regensburg

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1. Biokompatibilität und Formgebung von Biomaterialien für das Tissue Engineering von Knorpelgeweben	9
<b>2. DARSTELLUNG DER EIGENEN ARBEITEN</b>	<b>14</b>
2.1. Entwicklung eines für die Biosynthese von Knorpelzellen optimierten bioresorbierbaren Trägermatrixmodels	14
Eingebundene Publikationen des Kapitels	17
2.2. Entwicklung einer vollständig autologen Fibrinmatrix für die Herstellung von in vitro präformierten Knorpelgeweben	18
Eingebundene Publikationen des Kapitels	20
2.3. Formgebung und subkutane Implantation von dreidimensionalen, in vitro präformierten Knorpelgeweben im Tiermodell der thymusaplastischen Nacktmaus	21
Eingebundene Publikationen des Kapitels	24
2.4. Protektion von in vitro präformierten, subkutan implantierten, dreidimensionalen Knorpelgeweben durch Makroverkapselung und Immunmodulation	25
Eingebundene Publikationen des Kapitels	30
2.5. Biomechanische Eigenschaften von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben	31
Eingebundene Publikationen des Kapitels	34
2.6. Biostimulation von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben mittels niedrig intensivem Ultraschall	35
Eingebundene Publikationen des Kapitels	37
<b>3. DISKUSSION</b>	<b>38</b>
3.1. Entwicklung eines für die Biosynthese von Knorpelzellen optimierten bioresorbierbaren Trägermatrixmodels	38
3.2. Entwicklung einer vollständig autologen Fibrinmatrix für die Herstellung von in vitro präformierten Knorpelgeweben	42
3.3. Formgebung und subkutane Implantation von dreidimensionalen, in vitro präformierten Knorpelgeweben im Tiermodell der thymusaplastischen Nacktmaus	44

<b>3.4. Protektion von in vitro präformierten, subkutan implantierten, dreidimensionalen Knorpelgeweben durch Makroverkapselung und Immunmodulation</b>	<b>46</b>
<b>3.5. Biomechanische Eigenschaften von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben</b>	<b>52</b>
<b>3.6. Biostimulation von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben mittels niedrig intensivem Ultraschall</b>	<b>55</b>
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>5. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>63</b>
<b>6. TIERVERSUCHSGENEHMIGUNGEN</b>	<b>63</b>
<b>7. VERZEICHNIS DER EINGEBUNDENEN PUBLIKATIONEN</b>	<b>64</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>66</b>
<b>9. DANKSAGUNGEN</b>	<b>81</b>
<b>10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>83</b>

## 1. Einleitung

Die rekonstruktive Chirurgie erfordert zur Wiederherstellung von Form und Funktion individuell an die anatomischen Verhältnisse angepasste, vitale Gewebetransplantate. Gerade im Kopf-Hals-Bereich findet man eine Vielzahl komplex geformter Strukturen wie beispielsweise das äußere Ohr und die Trachea. Die individuell stark differierende, komplexe Formgebung dieser Strukturen stellt hohe Anforderungen an das für eine Rekonstruktion auszuwählende Transplantat. Kleinere Defekte lassen sich problemlos mit dem zur Verfügung stehenden, körpereigenen Knorpelreservoir unter Umgehung von Transplantatabstoßungsreaktionen autolog rekonstruieren (1-5). Bei der Rekonstruktion größerer Defekte stößt man jedoch schnell an die Grenzen der Verfügbarkeit autologer Knorpelreservoirs. Ein weiteres Problem stellt die Formung und Stabilität der autolog entnommenen Knorpeltransplantate dar. Bis heute steht sowohl für die Ohrrekonstruktion, als auch für die Trachearekonstruktion kein, den funktionellen und kosmetischen Anforderungen vollständig Rechnung tragendes, Rekonstruktionsverfahren zur Verfügung.

Für die Ohrmuschelrekonstruktion wurden eine Vielzahl von Techniken unter Verwendung autologen Rippenknorpels beschrieben (6-12). Keine dieser Techniken kann ein in sich geschlossenes, homogenes Knorpelstück bereitstellen. Die Rekonstruktion erfolgt zumeist durch die Kombination zweier oder mehrerer Rippenknorpelfragmente zu einem ohrähnlichen Stützgerüst. Diese Techniken sind operativ anspruchsvoll, stark abhängig von der Erfahrung des Operateurs und können zu Forminstabilität und kosmetisch unbefriedigenden Ergebnissen führen (13, 14). Ebenso verhält es sich mit der Rekonstruktion von Tracheadefekten. Kein körpereigenes Knorpelreservoir bietet eine entsprechend vorgeformte Knorpelstruktur, mit der sich ein in sich zusammenhängender Trachearing rekonstruieren ließe. Die Beschreibung einer Vielzahl operativer Verfahren und Rekonstruktionsmaterialien zur Trachearekonstruktion unterstreicht die bis heute geltende Problematik, sodass die Rekonstruktion eines komplexen Tracheastützgerüsts mit einem einzigen, dezidiert geformten autologen Knorpeltransplantat als unmöglich betrachtet werden kann (15-22).

Den Vorteilen vitaler, autologer Knorpeltransplantate steht bei der Rekonstruktion komplexerer Strukturen eine häufig unbefriedigende Anpassung der Transplantate

an die zu rekonstruierenden Defekte und deren begrenzte Verfügbarkeit gegenüber. Dies führte zur Intensivierung von Untersuchungen auf dem Arbeitsgebiet Tissue Engineering, der in vitro Herstellung autologer vitaler Gewebeersatzmaterialien. Die Reparatur von Gewebedefekten mittels im Labor hergestellter Gewebe zählt mittlerweile zu den größten Herausforderungen der Medizin (23-28). Mit Hilfe moderner Techniken des Tissue Engineerings wurden insbesondere bei der in vitro Herstellung von Knorpelgewebe bedeutende Fortschritte erzielt (29-31). Knorpelgewebe ist nicht vaskularisiert und besteht nur aus einem einzigen Zelltyp. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt durch Diffusion. Seine speziellen mechanischen Eigenschaften erhält das Knorpelgewebe durch eine umfangreich ausgebildete perizelluläre Matrix, die bis zu 98% des gesamten Gewebavolumens einnehmen kann. Sie ist vorwiegend aus dem knorpelspezifischen Kollagen Typ II und Proteoglykanen mit den Glykosaminoglykanen Chondroitin-4-Sulfat und Keratansulfat zusammengesetzt. Vor dem Hintergrund der begrenzten Verfügbarkeit autologer Knorpelgewebe steht am Anfang des Tissue Engineerings die in vitro Zellvermehrung. Die Chondrozyten werden enzymatisch aus der sie umgebenden Knorpelmatrix isoliert. Hiernach folgt die Vermehrung der Chondrozyten unter vorübergehender Umschaltung der Kollagensynthese in einer Monolayerkultur bis um den Faktor 1000. In dieser Phase zeigen die Chondrozyten einen fibroblastenähnlichen Phänotyp und exprimieren knorpelatypisches Kollagen I und III. Erst die erneute dreidimensionale Anordnung der Chondrozyten führt zur Wiederaufnahme der knorpeltypischen Kollagensynthese (Kollagen Typ II) und somit zur Knorpelmatrixproduktion (32, 33). Hierzu müssen die Chondrozyten stabil in eine dreidimensionale Trägerstruktur eingebettet werden. Die Trägersubstanz muss dabei eine suffiziente Diffusion von Nährmedien bis an die Zellen heran gewährleisten. Für einen klinischen Einsatz autologer Zellen ist der Schritt der Redifferenzierung von in vitro vermehrten Knorpelzellen von höchster Bedeutung. Sie muss möglichst in vitro eingeleitet und in vivo gesichert werden, um die Bildung von minderwertigem, wenig belastbarem Faserknorpel zu verhindern. Hierbei spielen morphogene Faktoren eine entscheidende Rolle (34-37). In vitro wurde eine (Re)-Differenzierung von Chondrozyten durch Faktoren wie TGF- $\beta$  und BMP bereits beobachtet. Die Aufrechterhaltung stabiler Ernährungsbedingungen der Transplantate mit morphogenen Faktoren über einen größeren Zeitraum wird durch entsprechende Kulturgeräte in Form von Perfusionskulturkammern erreicht. Hierzu befinden sich

mittlerweile industriell gefertigte, speziell an die entsprechenden Erfordernisse angepasste Kulturkammern im Handel (38).

Die zuvor erwähnte dreidimensionale Anordnung von Chondrozyten nach der Zellvermehrungsphase stellt einen zentral wichtigen Punkt für das Redifferenzierungsverhalten dar. Zu diesem Zweck wurden eine Vielzahl unterschiedlichster Trägermaterialien geprüft (39). Die ursprünglich gebräuchlichste Methode Zellen dreidimensional und somit gewebeähnlich anzuordnen stellte die Agarose-Suspensionskultur dar (40). Frisch entnommene, zuvor nicht expandierte Knorpelzellen behalten darin ihre charakteristische Kollagen II Synthese. Expandierte Chondrozyten, die in Monolayerkultur vorübergehend zu fibroblasten-ähnlichen Zellen dedifferenzierten, konnten in Agarose redifferenziert werden. Gelartige visköse Substanzen wie Agarosegel bieten zwar gute Ernährungsbedingungen und eine konzentrationsabhängig stabile, dreidimensionale Zellanordnung, lassen jedoch die erforderliche stabile dreidimensionale Formstabilität des Gesamttransplantates vermissen. Erhöht man den Festigkeitsgrad von Agarose durch Erhöhung der Konzentration, so verschlechtern sich gleichzeitig die Ernährungsbedingungen der Zellen. Ein weiterer Nachteil der Agarosegele liegt in der mangelnden Biokompatibilität, wodurch eine spätere klinische Anwendung eingeschränkt wäre. Die Suche nach praktikablen Alternativen führte zur Anwendung poröser und faseriger Strukturen (41, 42). Im Vordergrund dieser Untersuchungen standen resorbierbare, biokompatible Polymere. Gute Ergebnisse konnten mit resorbierbaren Vliesstrukturen aus Polyglycolid und Polylactid erzielt werden (43). Diese Polymervliesstrukturen sind uneingeschränkt biokompatibel, bieten eine ausreichende dreidimensionale Stabilität sowie ausreichende Ernährungsbedingungen während der Kulturphase. Als nachteilig erwiesen sich jedoch die inhomogene dreidimensionale Zellverteilung und die geringe Zellanhaftung an die Trägerstruktur.

Die Herstellung formstabiler Transplantate wurde erst durch die Kombination gelartiger Trägermaterialien mit faserartigen Trägerstrukturen ermöglicht (44). Diese Kombination ermöglicht eine stabile, dreidimensionale Zellanordnung im Trägermaterial mit optimalen Ernährungsbedingungen bei gleichzeitig hoher Formstabilität des Gesamttransplantates.

Mit Hilfe der beschriebenen Trägerstrukturen können vitale Gewebe mit interzellulärer Knorpelmatrix und knorpeltypischen Eigenschaften gezüchtet werden.

Tierexperimentelle Untersuchungen als Vorbereitung auf eine klinische Anwendung sind jedoch aufgrund der eingeschränkten Biokompatibilität der viskösen Agarosesuspension als bedenklich zu bezeichnen. Versuche am Tiermodell haben gezeigt, dass auf nicht biokompatibler Basis hergestellter Knorpel nach Transplantation die wichtigsten gewebetypischen Merkmale (Kollagen II, Aggrecan etc.) aufweist (45). Die verwendeten dreidimensionalen Trägerpolymere aus Poly-a-Hydroxysäuren degradieren, abhängig von der Zusammensetzung, in vivo ohne Gefährdung der Vitalität und des Phänotyps der Gewebe (46). Agarose- und Suspensionskulturen aus autologen Knorpelzellen wurden von Brittberg et al. für die Reparatur kleiner lokal begrenzter Defekte am Kniegelenk eingesetzt (47). Für größere Defektflächen an Gelenken hingegen müssen die Zellen dreidimensional in eine temporär formgebende und belastbare Struktur in Form von Polymervliesen eingebettet werden.

Zu Beginn der Untersuchungen lagen nur wenige, oftmals unzureichende Untersuchungen zum in vivo Verhalten in vitro hergestellter, vitaler Knorpelgewebe und keine Daten zu den biomechanischen Eigenschaften, sowohl vor als auch nach Transplantation, vor. Gerade für die plastisch rekonstruktive Chirurgie spielen die mechanischen Parameter und das Verhalten der Transplantate nach Implantation hinsichtlich möglicher Resorptionsvorgänge und Formveränderungen eine entscheidende Rolle. So stellt die Ohrmuschel ein komplex geformtes, kosmetisch exponiertes Körperteil dar, das mitunter hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt wird. Trachearinge nehmen bezüglich der vielfältig wirksam werdenden Zug- und Druckkräfte ebenfalls eine Sonderstellung unter den zu rekonstruierenden organoiden Strukturen im Kopf-Halsbereich ein. Die Formstabilität spielt hierbei ebenfalls eine entscheidende Rolle. Bisherige zur Anwendung kommende rekonstruktive Verfahren mit autologen Knorpel und Biomaterialien bieten nur unbefriedigende Ergebnisse bezüglich der Anpassung an Formgebung und Stabilität. Tierexperimentelle Untersuchungen zur in vivo Stabilität in vitro hergestellter, vitaler Knorpeltransplantate stellen hierbei einen notwendig Schritt auf dem Weg zu einer klinischen Anwendung dar.

Der aktuelle Stand der Forschung zu Beginn der in der Habilitationsschrift dargestellten Untersuchungen zeigt:

- (1) Zellsuspensionen aus dedifferenzierten und differenzierten Chondrozyten können in vitro unter Verwendung verschiedenster Biomaterialien zu dreidimensionalen Geweben angeordnet sowie eine Redifferenzierung und Matrixreifung eingeleitet werden.
- (2) In vitro hergestellte, nicht vollständig biokompatible Zell- Polymervliesgewebe können erfolgreich in Gelenke von Kaninchen und subkutan in Nacktmäuse transplantiert werden.
- (3) In vivo Untersuchungen und allgemeine Daten bezüglich der Herstellung geformter, optimiert- biokompatibler, vitaler Knorpeltransplantate liegen bisher nicht vor.
- (4) Informationen zur biomechanischen Qualität in vitro präformierter Knorpeltransplantate fehlen.
- (5) Methoden zur Transplantatprotektion in vivo sind nicht identifiziert.

## **1.1. Biokompatibilität und Formgebung von Biomaterialien für das Tissue Engineering von Knorpelgeweben**

Biomaterialien nehmen in der Regeneration von Geweben und Organen und der Wiederherstellung deren Funktion eine zentrale Rolle ein. Die wissenschaftliche Arbeitsrichtung 'Tissue Engineering' subsumiert alle wissenschaftlichen Arbeiten die sich mit der in vitro und in vivo Herstellung und Regeneration unterschiedlicher Gewebe wie beispielsweise Haut, Knorpel, Knochen, Gefäße, Nerven und Leber befassen (48). Weitere Organe und Gewebe lassen sich hinzufügen, wobei die Erstgenannten die bisher am ausgiebigst erforschten Gewebe- und Organe darstellen (49-59). Bioresorbierbare und nicht- bioresorbierbare Polymere finden außerhalb des Bereiches Tissue Engineering bereits vielfältig Verwendung. Beispiele hierfür sind Polymethyl- metacrylat- Knochenzement, bioresorbierbare Polyglycolsäure- Gewebenähte, Poly- glycolcolactid- Knochenschrauben und Polyvinylsiloxan- Dentalabdruckmaterialien sowie Polyethylenglycol als Medikamenten- Releasematerial (60) .

Neben dem Grundsatzdiskurs, ob für das Tissue Engineering bioresorbierbare oder auch nicht bioresorbierbare Materialien verwendet werden sollen, lassen sich in den entsprechenden Anwendungsgebieten zumeist eindeutige Argumente für das eine oder das andere Biomaterial finden (61). So kommt beispielsweise im Hautersatz kein dauerhaft im zu rekonstruierenden Gewebe zurückbleibendes Biomaterial zur Anwendung. Bei der Rekonstruktion von großen Gefäßen, Herzklappen und Strukturen des knorpeligen und- knöchernen Stützgerüsts ist die Entscheidungsfindung nicht so eindeutig. Gerade bei der Rekonstruktion biomechanisch belasteter Gewebe muss von Beginn an eine maximale biomechanische Stabilität gewährleistet sein. Die meisten natürlichen bioresorbierbaren Materialien bieten jedoch gerade diese Eigenschaft nicht oder nur in unbefriedigendem Umfang.

Grundsätzlich werden für die überwiegende Anzahl der Anwendungen des Tissue Engineerings, aufgrund des Grundgedanken ein Gewebe oder ein Organ aus körpereigenem Gewebe rückstandsfrei zu rekonstruieren, bioresorbierbare Biomaterialien bevorzugt. Die Vielfalt der zur Verfügung stehenden Materialien und die Vielfalt der Anwendungsformen zeigen auf, dass es weder ein Material für nur

eine, noch ein Material für alle möglichen Anwendungsformen gibt. Vielmehr gilt es die Materialeigenschaften so gut wie nur möglich an die biologischen und medizinischen Erfordernisse anzupassen.

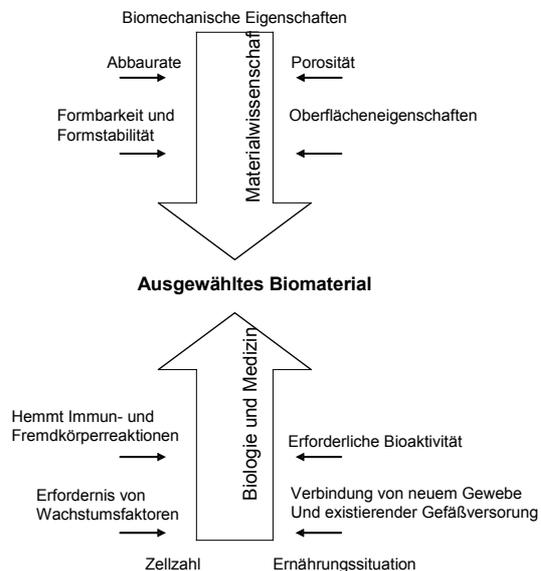


Abbildung 1:

Einflußfaktoren bei der Auswahl eines geeigneten Biomaterials

Obwohl die Anzahl unterschiedlicher Materialien die von Materialwissenschaftlern hergestellt werden könnten, sehr groß ist, spielen für das Tissue Engineering nur eine begrenzte Anzahl dieser Materialien eine praktische Rolle. Tabelle 1 bietet einen Überblick über die häufigsten im Tissue Engineering verwendeten resorbierbaren und nicht resorbierbaren synthetischen und natürlichen polymeren Biomaterialien.

Lässt man die nicht- bioresorbierbaren Polymere aufgrund ihrer besonderen Stellung im Tissue Engineering unberücksichtigt, kommen für weiterführende Erörterungen nur natürliche und synthetische resorbierbare Materialien in Betracht. Hierbei spielen die synthetischen Polymere, im Besonderen die Polyester Nr. 14 – 18 der Tabelle 1, aufgrund ihrer gut charakterisierten Eigenschaften in der Anwendung des Tissue Engineerings verschiedener Gewebe eine besondere Rolle (62). Gemeinsam zueigen sind ihnen die Bioresorbierbarkeit und die Zulassung durch die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA. In der Phase der Degradation können die monomeren Komponenten jedes der genannten Polymere auf natürlichen Abbauwegen entfernt werden; Glycolsäure wird zu Abbaumetaboliten umgewandelt und Milchsäure wird durch den Tricarboxylsäurezyklus abgebaut und durch den

Organismus entsorgt. Einige bereits in den 70er Jahren durchgeführte Studien konnten zeigen, dass diese Polymere keine aktive Stimulation des spezifischen Immunsystems bewirken, jedoch durch die besondere Abbaureaktion des Glycolids und der Milchsäure und durch die hierdurch bedingte Änderung des Gewebemilieus in den sauren pH Bereich das unspezifische Immunsystem aktivieren (63, 64). So werden diese Eigenschaften insbesondere bei Verwendung dieser Materialien im gut an das Immunsystem angebundenen Gewebe, z.B. bei der subkutanen Knorpelimplantation, als der Hauptnachteil identifiziert. Das in einigen Studien dokumentierte autolytische in vitro Degradationsverhalten bestätigt die in vivo gemachten Beobachtungen bezüglich der Änderung des Umgebungsmilieus in ein saures Milieu (65). Obwohl diese Eigenschaften weitere Untersuchungen der Polyester im Hinblick auf eine klinische Anwendung des Tissue Engineerings hinfällig machen sollten, wurde kaum ein anderes Biomaterial in seiner Variationsbreite derart intensiv beforscht. In einem ausgewogenen Umfang beleuchten diese Studien die in vitro und in vivo Eigenschaften der Polyester-Materialien (66-69). Untersuchungen zur klinischen Anwendung finden sich vor allem auf dem Gebiet des Knorpelengineering im Gelenkknorpelersatz (70-72). Dies implementiert den Schluss, dass die in den meisten in vitro Studien als gut beschriebenen Materialeigenschaften und deren Nutzbarkeit für das Tissue Engineering an den nach einer Implantation stattfindenden physiologischen Reaktionen des Körpers beim Abbau des Polyestermaterials scheitern (73-75). Beleuchtet man in vivo Untersuchungen etwas näher, so muss die oftmals optimistisch beurteilte Nutzbarkeit von Polyestermaterialien für den Gewebeersatz etwas nüchterner beurteilt werden (76, 77).

Nahezu alle in vivo Untersuchungen beobachten Fremdkörperreaktionen in Form von Fremdkörperriesenzellen, eine deutliche Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten sowie eine nach Abklingen der frühen Entzündungsphase vorliegende fibroblastäre Gewebeumbildung (Narbe) in unterschiedlich starkem Ausmaß (78, 79). Das Ausmaß der fibroblastären Gewebeumbildung hängt hierbei entscheidend vom gewählten Implantationsort (subkutan, intramuskulär etc.) und der zur Anwendung kommenden Zellzahl ab. Eine ausreichende Gewebedifferenzierung der verwendeten Gewebearart (z.B. Knorpel, Knochen) ist nur durch eine immens hohe, durch den Tissue Engineering- Amplifikationprozess nur schwer durchführbare Zellzahldichte, z.B. als Suspensionskultur zu erreichen. Wobei die entzündlichen

Reaktionen nach der Implantation einer ausreichenden Gewebedifferenzierung entgegenstehen. Anstrengungen dieses Problem zu lösen, wurden vor allem auf dem Sektor der Materialkunde unter dem Gesichtspunkt fokussiert, die Gewebedifferenzierung so früh wie nur möglich einzuleiten und zu beschleunigen, um die nach der Implantation einsetzende Entzündungsreaktion auf ein bereits differenziertes, nur gering vulnerables Gewebe treffen zu lassen. Hierbei wurde besonders auf natürliche Polymere, wie Hyaluronsäure, Kollagen, Fibrin oder Alginat zurückgegriffen, die zumeist durch Ausbildung von Co- Polymeren an der Oberfläche der Polyester gebunden wurden (80-82). Hierdurch konnten die Nachteile beim Abbauprozess der Polyester nicht eliminiert werden, jedoch im Einzelfall eine schnellere und bessere Gewebedifferenzierung erreicht werden. Eine alleinige Anwendung von natürlichen Polymeren, wie Hyaluronsäure, Kollagen und Alginat als Bioträgermaterial lag darauf hin nahe und brachte in vitro auch die gewünschten Ergebnisse, scheiterte in vivo und klinisch im Subkutangewebe jedoch vornehmlich an der ungenügenden Formgebung und Formstabilität (83-93).

Für eine große Anzahl von Anwendungen im Tissue Engineering werden formstabile, drei- und zweidimensional vernetzte Faservliese gefordert, um eine genügende Zellanzahl ausreichend stabil im Raum zu vernetzen. Die hierfür zur Verfügung stehenden bioresorbierbaren Polyester sind zwar ausreichend stabil und formbar, und zeigen zumindest in vitro keine direkt negativen Einflüsse auf die angekoppelten Zellen, bieten jedoch bedingt durch ihr spezifisches Degradationsverhalten unübersehbare Nachteile in vivo und in der klinischen Anwendung. Ein ideales bioresorbierbares Material müsste die biomechanischen und formgebenden positiven Eigenschaften unter Reduzierung oder sogar Eliminierung der negativen Degradationseigenschaften aufweisen (94). Die in der Literatur beschriebenen biodegradierbaren Fasern aus organischen Polymeren wie z.B. Polyglycosiden, D/L-Polylactiden oder Calciumphosphat haben unter anderem den Nachteil, dass sie rekristallisieren und so Fremdkörperreaktionen hervorrufen können (95, 96). Durch die Degradationsprodukte kommt es regelmäßig zu intolerablen pH-Verschiebungen am Implantationsort. Aufgrund fehlender Alternativen bei faserartigen, resorbierbaren Biomaterialien müssen diese Effekte vorerst toleriert und Methoden zur Dämpfung dieser Eigenschaften entwickelt werden.

Die bisher verwendeten in vitro Modelle zur Züchtung von Knorpelgewebe für die Kopf- und Halschirurgie lassen eine klinische Anwendung aufgrund fehlender Daten

zur Biokompatibilität und fehlender plastischer Stabilität nicht zu. Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurden basierend auf den bis dato bestehenden Fragestellungen aufgebaut und hatten sich zum Ziel gesetzt die Datenlage bezüglich der Herstellung dreidimensionaler, biomechanisch belastbarer Knorpelgewebe für die Kopf- und Halschirurgie zu verbessern.

Tabelle 1:

Resorbierbare und nicht resorbierbare synthetische und natürliche polymere Biomaterialien für das Tissue Engineering (Auszug)

<b>Nicht-Bioresorbierbare Polymere</b>	<b>Bioresorbierbare Polymere</b>	<b>Biologisch gewonnene Polymere</b>
1 Poly-ethylen	14 Poly-glycol-säure	24 Alginat
2 Poly-vinyliden-fluorid	15 Poly-lactid-säure	25 Chondroitin-6-sulfat
3 Poly-tetra-fluoroethylen	16 Poly-dioxanon	26 Chitosan
4 Poly-vinyl-alkohol	17 Poly-lactid-co-glycolid	27 Hyaluronsäure
5 Poly-hydroxy-alkanoat	18 Poly- $\epsilon$ -caprolacton	28 Collagen
6 Poly-ethylen-terephthalat	19 Poly-anhydrid	29 Polylysin
7 Poly-butyl-terephthalat	20 Poly-phosphazen	30 Dextran
8 Poly-methyl-meth-acrylat	21 Poly-ortho-ester	31 Heparin
9 Poly-hydroxy-ethyl-metacrylat		32 Fibrinogen / Thrombin
10 Poly-N-iso-propyl-acrylamid		
11 Poly-dimethyl-siloxan		
12 Poly-pyrrol		
13 Poly-ethylen-oxid		

## 2. Darstellung der eigenen Arbeiten

### 2.1. Entwicklung eines für die Biosynthese von Knorpelzellen optimierten bioresorbierbaren Trägermatrixmodells

*Haisch A, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittlinger M*

Tissue-engineering of human cartilage for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin- and polymerfleece structures.

HNO. 1996;44:624-29

*Haisch A, Marzahn U, Mobasheri A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M*

Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery.

Histol Histopathol. 2006;21:467-476

Die bisher verwendeten in vitro Modelle zur Züchtung von Knorpelgewebe lassen eine klinische Anwendung aufgrund fehlender Daten zur Biokompatibilität und fehlender plastischer Stabilität nicht zu. Ein Lösungsansatz dieser Problematik wurde mit der Verwendung vernetzter, resorbierbarer biokompatibler Polymervliese gefunden. Diese Faserstrukturen bieten eine hohe mechanische Festigkeit, eine maximal große interne, homogene Oberfläche bei geringem Materialanteil. Nachteilig hierbei erscheint die Beobachtung, dass nach Einbringen von Chondrozyten in vernetzte Polymervliese, abhängig von der Faserdichte und den gewählten Oberflächenbeschichtungen, die dreidimensionale Chondrozytenverteilung stark differiert. Eine homogene dreidimensionale Chondrozytenverteilung bildet jedoch die Voraussetzung für die Produktion einer stabilen homogenen Knorpelmatrix.

Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, das phänotypische Erscheinungsbild von isolierten Chondrozyten in einem vernetzbaren Fibrinverband und das Verhalten des Fibrin-Chondrozytenverbandes in Verbindung mit einem formstabilen, resorbierbaren Polymervlies zu untersuchen und zu beschreiben (A).

Fibrin findet in der operativen Medizin seit nunmehr 20 Jahren eine breite Anwendung. Daten zur klinischen Anwendung, Biokompatibilität, Infektionssicherheit,

Resorptionsdauer und zum immunologischen Verhalten liegen in ausreichendem Umfang vor. Frisch entnommene native Chondrozyten bleiben in Fibrin vital und zeigen den für Knorpel spezifischen Phänotyp.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die in Monolayerkultur vermehrten, dedifferenzierten Chondrozyten, nach Einbringen in ein dreidimensionales fibrinvernetztes Gel, knorpelspezifische Bestandteile wie Kollagen II, Chondroitinsulfat und Aggrecan bilden. Gleichzeitig ließ sich eine über 14 Tage stabile homogene dreidimensionale Verteilung im retikulären Fibringerüst nachweisen. Diese Ergebnisse ließen sich auch in Kombination der Zell- Fibrinmatrix mit einem resorbierbaren Polymervlies über einen Zeitraum von 6 Wochen reproduzieren. Während dieser Kulturzeit kam es unter der Degradation des fibrinvernetzten Gels zur Ausbildung eines kompakten Knorpelgrundgerüsts. Immunhistochemisch konnten knorpelspezifische Bestandteile wie Kollagen II und Proteoglycane nachgewiesen werden. Die begrenzte mechanische Stabilität des vernetzbaren Fibrins bietet in der Kombination mit einem Polymervlies den Vorteil, dass initial eine stabile Einbettung und homogene Zellverteilung im Polymervlies erreicht werden kann. Dies ist besonders bei einer inhomogenen Faserdichte der Polymervliese von Wichtigkeit. Parallel zur Degradation und Auflockerung des Fibrinverbandes kommt es zur Ausbildung einer Knorpelmatrix und zur Verfestigung der Knorpel- Polymervliesstruktur. Das in diesen Untersuchungen verwendete Polymervlies zeigte gegen Ende der Kulturzeit starke Degradationserscheinungen. Wichtig erscheint hierbei, dass der Zeitraum zwischen der schrittweise zunehmenden Degradation des Fibrinnetzes nach 7 - 14 Tagen und der Ausbildung einer Knorpelmatrix, zur Stabilisierung der homogenen dreidimensionalen Verteilung der Chondrozyten, überbrückt werden muss. Hierzu erscheint eine 6- wöchige Stabilität des Polymervlieses vollkommen ausreichend.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse liegt der Schluss nahe, fibrinvernetzte Gele in Kombination mit resorbierbaren, formbaren Polymervliesen als dreidimensionales formbares Grundgerüst für die Herstellung autologer Knorpelgewebe zu verwenden. Die nach wie vor kontrovers diskutierte Infektionssicherheit industriell gefertigter Fibrinpräparate könnte durch den Einsatz autologer Fibrinpräparate erheblich erhöht werden. Diese bieten die gleichen biomechanischen Eigenschaften wie industriell gefertigte Präparate. Ein weiterer Vorteil autologer Fibrinpräparate liegt darüber hinaus in der Vermeidung immunologischer Reaktionen. Mit dem in diesen

Untersuchungen beschriebenen Modell bietet sich erstmals die Grundlage, in vitro hergestellte autologe vitale Knorpeltransplantate unter ausschließlicher Verwendung biokompatibler Komponenten in eine klinische Anwendung zu überführen.

Alternativ zur Untersuchung dreidimensionaler Matrixkomponenten unter Verwendung von Biomaterialien ergibt sich die Fragestellung, inwiefern eine dreidimensionale Anordnung von Chondrozyten ohne die Verwendung eines Biomaterials eine Knorpelneogenese erlaubt. Hinsichtlich der Anforderungen in der plastisch- rekonstruktiven Chirurgie, wo bei größeren, komplex geformten anatomischen Strukturen eine dreidimensionale Formgebung erforderlich ist, können kleinere Gewebedefekte im Kopf- Halsbereich unter Umständen durch die Verwendung von 'High density- Knorpelkonstrukten' direkt in ein Transplantatlager eingebracht und zur Ausreifung gebracht werden, ohne dabei eine biokompatible, geformte Trägermatrix zu verwenden. Gerade vor dem Hintergrund einer möglichen Interaktion von Biomaterialien mit dem Organismus erscheint die Klärung dieser Frage notwendig. So wurden in einer weiteren Untersuchung frisch isolierte, aurikuläre, porcine Chondrozyten in Monolayerkulturen über bis zu 7 Passagen kultiviert (J). Von jeder Passage wurden Chondrozyten in eine 'High density' Kultur überführt und mittels Transmissions- Elektronenmikroskopie untersucht. Die Analyse der Expression knorpeltypischer Marker wie Kollagen II, knorpeltypisches Proteoglycan, Fibronectin,  $\beta$ 1-Integrin sowie Metalloproteinasen (MMP-9, MMP-13), Cyclooxygenase-2 und Caspase-3 wurden mittels Western Blot bestimmt. Nach Dedifferenzierung der Chondrozyten in Monolayerkultur wurden die Zellen der Passage 0-4 in eine 'High density' Kultur überführt und konnten dort ihren Phänotyp wiedererlangen, was in einer Expression von Kollagen II, Proteoglycan, Fibronectin und  $\beta$ 1-Integrin Ausdruck fand. Chondrozyten der Passage 5-7 konnten mit steigender Passageanzahl nicht redifferenzieren und es konnten keine knorpeltypischen Proteine nachgewiesen werden. Vielmehr zeigten diese Kulturen stattdessen eine Expression von MMP-9, MMP-13, COX-2 und Caspase-3 als Ausdruck des apoptotischen Zelluntergangs.

Die Untersuchung lässt den Schluss zu, dass unter Berücksichtigung einer Anzahl von bis zu fünf Passagen (P0-P4), in Monolayerkultur vermehrte aurikuläre Chondrozyten in 'High density' Kulturen überführt und redifferenziert werden können. Ab Passage 5 ist mit einem Untergang von aurikulären Chondrozyten zu rechnen und eine Redifferenzierung ausgeschlossen. Dieses Wissen erlaubt eine Anwendung

von 'High density' Kulturen in der Rekonstruktion von räumlich begrenzten, nicht vielschichtig geformten Gewebedefekten in der plastisch- rekonstruktiven Chirurgie.

### **Eingebundene Publikationen des Kapitels**

**Haisch A**, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M

Tissue-engineering of human cartilage for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin- and polymerfleece structures.

HNO. 1996;44:624-29

**Haisch A**, Marzahn U, Mobasheri A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M

Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery.

Histol Histopathol, 2006;21:467-476

## **2.2. Entwicklung einer vollständig autologen Fibrinmatrix für die Herstellung von in vitro präformierten Knorpelgeweben**

*Haisch A, Loch A, David J, Pruß A, Hansen R, Sittinger M*

Preparation of an completely autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering.

Med Biol Eng Comput. (Cell Eng). 2000;38(6):686-89

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war durch Arbeiten anderer und der eigenen Arbeitsgruppe deutlich geworden, dass vernetztes Fibrin ein ideales Trägermaterial für die in vitro Chondrogenese darstellt. Insbesondere bezüglich Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit gab es zum Zeitpunkt der Untersuchung kein vergleichbares Biomaterial mit derartig guten biomechanischen und biologischen Eigenschaften zur präklinischen Nutzung für das extraartikuläre Knorpelengineering. Vernetzbares Zweikomponenten- Fibrin konnte bereits kommerziell erworben werden. Die Hersteller bedienten sich bei der Herstellung der Fibrinogenkomponente frühzeitig humaner Quellen. Bei der Herstellung der Thrombinkomponente wurde initial bovines Plasma als Ausgangsmaterial verwendet, wobei dieser Umstand bei wiederholter Anwendung der Produkte in zunehmendem Maße allergische Reaktionen beobachten ließ, was letztendlich zur Änderung der Herstellungsbedingungen und der Verwendung humaner Plasmaquellen führte. Allergische Reaktionen wurden hiernach deutlich seltener beobachtet. Durch die Verwendung von Virus- Test-Systemen konnte die Anwendungssicherheit der Produkte deutlich erhöht werden, was jedoch mit einem deutlichen Anstieg der Herstellungskosten behaftet war. Aber auch dieser Umstand brachte vor dem Hintergrund des langsam wachsenden Verständnisses für die BSE-Problematik keine vollständige Sicherheit bei der Verwendung gepoolter humaner beziehungsweise boviner Komponenten.

Dem Anspruch des Tissue Engineerings, Gewebe auf rein autologer Basis zur Verfügung zu stellen, wurden die Verwendung kommerzieller Fibrinpräparate nicht gerecht, zum einen aufgrund der Verwendung von gepooltem humanen Plasma und zum anderen durch die Unsicherheit bezüglich einer möglichen Infektionsübertragung. Aus der klinischen Anwendung im angloamerikanischen Raum waren, bedingt durch eine damals nicht vorhandene FDA-Zulassung von

kommerziellen Fibrinprodukten, verschiedene Techniken bekannt Fibrinogen auf autologer Basis herzustellen. Doch selbst diese 'autologe' Methode hatte im Sinne des Tissue Engineerings einen Schönheitsfehler, da das Thrombin nicht autolog gewonnen wurde, sondern zumeist bovinen Ursprungs war. Dieser Umstand beruhte darauf, dass bis dato keine praktisch umsetzbaren Herstellungsmethoden entwickelt waren, die es zuließen intraoperativ beziehungsweise präoperativ Thrombin auf autologer Basis herzustellen.

Unsere Arbeitsgruppe stellte sich darauf hin die Aufgabe ein Herstellungsverfahren zu entwickeln, das eine streng autologe Herstellung der Thrombinkomponente unter Laborbedingungen gewährleistet. Die Fibrinogenkomponente des Zweikomponenten-Fibrinklebers wurde nach einem klinisch gängigen Kryopräzipitationsverfahren (97) basierend auf 200 ml gefrorenen Plasmas (FFP) hergestellt, wobei der hierbei entstehende Überstand als Ausgangsmaterial für die Thrombinherstellung diene. Für die Thrombinherstellung wurde eine von Haystek (98) im Jahre 1975 beschriebene Methode modifiziert und die Thrombinkomponente mittels Ionen- Austausch-Chromatographie unter der Verwendung von Sephadex A-50 und Natriumchlorid generiert. Die hierdurch generierten Prothrombin- und Thrombinkonzentrationen wurden mit einem STA-Koagulations-Analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) und einem KC4-Mikrokoagulations-Analyser (Amelung, Germany) bestimmt. Die Anwendung dieses Verfahrens gewährleistet die Herstellung einer ausreichenden Menge an hochkonzentriertem Thrombin, vergleichbar mit der Thrombinaktivität kommerzieller Fibrinprodukte. Die an sich ausreichende Thrombinaktivität lässt sich durch die Zugabe von rekombinantem Thromboplastin und einer dadurch induzierten Aktivierung des in den Thrombinsamples vorhandenen inaktiven Prothrombins bei Bedarf zusätzlich erhöhen. Als Nebenprodukt dieses Herstellungsverfahrens fällt gerinnungsfaktorenfreies, autologes Plasma an, das als autologer Medien- Zusatz für die Chondrozytenzellkultur verwendet werden kann.

Die in dieser Arbeit dargestellte Entwicklung einer streng autologen, biologischen Fibrinträgermatrix vermeidet die Gefahr einer Infektionsübertragung und allergisch bedingter Reaktionen. Verglichen mit kommerziellen Produkten gewährleistet dieses Verfahren darüber hinaus größere Mengen bei gleichzeitig niedrigen Herstellungskosten und stellt somit einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung biokompatibler, bioresorbierbarer Trägermaterialien für das Tissue engineering humaner Knorpelgewebe dar.

**Eingebundene Publikationen des Kapitels**

**Haisch A**, Loch A, David J, Pruß A, Hansen R, Sittinger M

Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering.

Med Biol Eng Comput. (Cell Eng). 2000;38(6):686-89

### **2.3. Formgebung und subkutane Implantation von dreidimensionalen, in vitro präformierten Knorpelgeweben im Tiermodell der thymusaplastischen Nacktmaus**

*Haisch A, Klaring S, Groger A, Gebert C, Sittinger M*

A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2002;259(6):316-21

Basierend auf den besonderen Erfordernissen der plastisch rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Halsbereich wurde bereits frühzeitig die Notwendigkeit offenbar, bereits in vitro eine Formgebung der Trägermatrix darzustellen, die nach erfolgter Implantation im Organismus aufrecht erhalten werden konnte und die zu rekonstruierende Gewebeform widerspiegelt. Dieser Aspekt war bei der Optimierung der Trägermatrix ständig vordergründig und führte im Verlauf zur Darstellung einer Untersuchung die diesen Aspekt im Besonderen als Grundlage haben sollte (E).

Auch in diesen Untersuchungen wurde vor dem Hintergrund einer klinischen Anwendung, im Gegensatz zu einigen anderen Arbeitsgruppen und deren Untersuchungen, großer Wert auf die Verwendung humaner Chondrozyten gelegt. Humaner Nasenseptumknorpel der im Rahmen von Nasenseptumplastiken als Abfallprodukt vorlag wurde gepoolt und enzymatisch digestiert und die hierdurch erhaltenen Chondrozyten in Monolayerkulturen in bis zu 4 Passagen amplifiziert. Hierdurch konnte aus kleinen Gewebestücken eine ausreichende Anzahl von Chondrozyten für die Versuchsdurchführung generiert und gleichzeitig realitätsnahe Erkenntnisse für eine spätere klinische Anwendung gewonnen werden. Ein von einem humanen Ohr im Abdruckverfahren hergestellter, steriler Silikonhohlzylinder wurde mit PLLA- PGLA- Fasern aufgefüllt und für die Zellbesiedelung vorbereitet. Die isolierten Chondrozyten wurden in einer Fibrinogenlösung suspendiert und in die PLLA- PGLA- Fasern eingeschwemmt bis die Fasern vollständig mit der Chondrozytenlösung durchtränkt waren. Zur Fixierung der dreidimensionalen Chondrozytenverteilung wurde abschließend durch Zugabe von Thrombin die Fibrinogenlösung vernetzt. Der Silikonhohlzylinder wurde entfernt und das einer Ohrmuschel nachempfundene Knorpelkonstrukt in einem Bioreaktor (38) (Minucell,

Regensburg) unter Standardbedingungen bis zu 6 Wochen in vitro inkubiert. Die thymusaplastische Nacktmaus stellt vor dem Hintergrund der Simulation einer autologen Transplantation und der tatsächlich stattfindenden xenogenen Transplantation das am besten geeignete Tiermodell dar. Aus tierschutzrechtlichen Gründen war eine subkutane Implantation des gesamten humanen Ohrmuschelkonstruktes ausgeschlossen. Es wurden alternativ hierzu repräsentative Fragmente (1 x 1 x 0,2 cm) des Konstruktes präpariert und subkutan in zuvor präpartierte Hauttaschen implantiert und für 6 und 12 Wochen in vivo belassen. Als Kontrollgruppe dienten Fibrin- PLLA- PGLA- Faserkonstrukte ohne Chondrozytenbesiedelung. Die Untersuchung der Chondrozytenkonstrukte während der in vitro Kultivierung zeigte über den gesamten Kulturzeitraum ein stabiles und flexibel erscheinendes Ohrmuschelkonstrukt. Histologisch war die homogene dreidimensionale Chondrozytenverteilung innerhalb des Konstruktes offensichtlich, wobei eine langsam und stetig voranschreitende Fibrindegeneration zu beobachten war, sodass die Transplantatstabilität mit zunehmender Kultivierungsdauer von den PLLA- PGLA- Fasern und der sich sehr langsam bildenden perizellulären Knorpelmatrix bestimmt wurde. Die makroskopische und mikroskopische morphologische Untersuchung der in vivo generierten Knorpelkonstrukte legte dar, dass in vivo eine deutlich ausgeprägtere und nachhaltigere Chondrogenese zu verzeichnen war. Makroskopisch ähnelten die explantierten Knorpelkonstrukte in Konsistenz und Erscheinungsbild nativem Knorpel. Die Konstrukte erschienen leicht reduziert in Größe und Form und waren von einer dünnen fibrösen Kapsel umgeben. Histologisch und immunhistologisch konnten knorpeltypische Matrixbestandteile wie Kollagen II und Proteoglycane nachgewiesen werden. Obwohl insbesondere in den Randbezirken der Knorpelkonstrukte Zeichen von Resorptionsvorgängen zu beobachten waren, kam es bei keinem der mit Chondrozyten besiedelten Konstrukte zu einer vollständigen Resorption. Im Gegensatz hierzu konnten die unbesiedelten Trägerkonstrukte nach einem Zeitraum von 12 Wochen aufgrund von Resorptionsprozessen nicht mehr identifiziert werden.

Die dargestellte Arbeit war zum Zeitpunkt der Durchführung durch die Verwendung humaner Chondrozyten und der, der Implantation vorangegangenen Chondrozytenamplifikation einzigartig, vor allem im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung (E). Mit Ausnahme weniger anderer Arbeitsgruppen (27, 31, 99) kamen bei den meisten Arbeitsgruppen nahezu ausschließlich bovine

Chondrozyten ohne vorherige Zellamplifikation zur Anwendung. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse bildeten die Basis für eine auf eine klinische Anwendung ausgerichtete Gestaltung weiterführender Untersuchungen.

**Eingebundene Publikationen des Kapitels**

**Haisch A**, Klaring S, Groger A, Gebert C, Sittinger M

A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2002;259(6):316-21

## **2.4.      **Protektion von in vitro präformierten, subkutan implantierten, dreidimensionalen Knorpelgeweben durch Makroverkapselung und Immunmodulation****

*Haisch A, Gröger A, Radke C, Ebmeyer J, Sudhoff H, Grasnack G, Jahnke V, Sittinger M*

Macroencapsulation of human cartilage implants: polyelectrolyte complex membrane encapsulation.

Biomaterials. 2000;21(15):1561-66

*Haisch A, Wanjura F, Radke C, Leder-Johrens K, Groger A, Endres M, Klaering S, Loch A, Sittinger M*

Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2004;261(4):216-24

*Haisch A, Gröger A, Gebert C, Leder K, Ebmeyer J, Sudhoff H, Jovanovic S, Sedlmaier B, Sittinger M*

Creating artificial perichondrium by polymer complex membrane macroencapsulation: Immune protection and stabilization of subcutaneously transplanted tissue-engineered cartilage.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Apr;262(4):338-44

Nach Implantation in das Transplantatlager kommt es sowohl bei nativen, als auch bei in vitro hergestellten Knorpeltransplantaten zu bisher nicht steuerbaren Abstoßungsreaktionen und Resorptionsvorgängen. Verantwortlich hierfür scheinen neben makrophagenvermittelten zellulären Reaktionen im Rahmen der Wundheilung auch Autoantikörper zu sein, die sich gegen verschiedene Kollagentypen richten können (100, 101). Eine geeignete Methode zur Zell- und Gewebeprotektion wurde bei der Mikroverkapselung von Pankreasgewebe gefunden. Lim und Sun (102) zeigten, dass mittels der Alginate/Polylysin- (ALG/PLL) Methode Langerhans'sche Inselzellen erfolgreich verkapselt und unerwünschte Immunreaktionen verhindert werden können. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen den Produktionsprozess

des aus Seealgen gewonnenen Alginates so zu standardisieren, dass eine gleich bleibende Qualität für den Anwender gewährleistet werden kann. Zudem entstehen oftmals toxische Nebenprodukte die eine Handhabung mit sensiblen biologischen Materialien erschweren. Auch büßt die Alginate-Kapsel ab einem bestimmten Umfang ihre mechanische Stabilität ein, was sie für eine Makroverkapselung von Knorpel ungeeignet erscheinen lässt.

Eine alternative Methode zur Gewebeerkerapselung unter Verwendung von Natriumcellulosesulfat (NaCs) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) wurde von Dautzenberg et al. beschrieben (103). Beide Substanzen lassen sich in geeigneter Qualität herstellen und bieten adäquat steuerbare molekulare Parameter. Weiterhin bilden sie spontan Membranen, die unter physiologischen Bedingungen belastbar sind und sich als biokompatibel erwiesen haben. Bezüglich der Verkapselung von Knorpeltransplantaten wird bei Einstellung einer definierten Porengröße (20kD) die Penetration von Makrophagen, Leukozyten und Antikörpern verhindert und somit ein ausreichender Schutz vor immunologischen Reaktionen erwartet. Der freie Austausch niedermolekularer Substanzen sollte jedoch nicht behindert werden, um sowohl den Abfluss kataboler Substanzen als auch den Einstrom von Nährstoffen wie Glucose und Sauerstoff zu gewährleisten. Durch die Makroverkapselung von nativen humanen Knorpeltransplantaten sollten erstmalig Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Wirtsorganismus und verkapselten Knorpeltransplantaten erlangt werden (B).

Nativer humaner Nasenseptumknorpel wurde verkapselt (Gruppe 1) und unverkapselt (Gruppe 2) subkutan in die Rückenregion von je sechs thymusaplastischen Nacktmäusen (CD-1 nu/nu) implantiert und nach einer, vier, acht, zwölf und sechzehn Wochen explantiert. Die untersuchte PEC- Membran stellte durch den eingestellten Cut- off von 20 kDa eine Immunbarriere dar. Allerdings bedingte die Kapselmembran an ihrer Außenseite, verglichen mit unverkapselten Knorpeltransplantaten, eine verstärkte Immunreaktion. Diese verlief, verglichen mit anderen Verkapselungsmethoden wie Alginate/Polylysin, in einem für das umgebende Gewebe und das Transplantat verträglichen Rahmen. Das fibroblastäre Wachstum war an der Kapselmembran nur unwesentlich stärker als an der freien unverkapselten Knorpeloberfläche der Kontrollgruppe. Es kam in diesem Zusammenhang nicht zu einem, wie bei der Verkapselung mit Alginate berichteten Untergang der Transplantate. Bei Transplantaten der Gruppe 1 konnte sowohl in

peripheren, als auch in zentralen Bezirken zu allen Zeitpunkten vitaler Knorpel nachgewiesen werden. Somit scheinen nicht nur eine adäquate Immunprotektion, sondern auch eine ausreichende Versorgung mit Glucose und Sauerstoff, sowie der Ausstrom kataboler Substanzen gewährleistet zu sein. Der Cut-off schien hierbei den entscheidenden Faktor darzustellen. Dieser garantierte, dass in vitro der unkontrollierte Ausstrom von matrixbildenden Makromolekülen, wie zum Beispiel Kollagenen und Proteoglycanen, verhindert und gleichzeitig eine ausreichende Versorgung mit nutritiven Substanzen ermöglicht wurde (104). Darüber hinaus wurde vivo das native Knorpeltransplantat vor Zellinfiltrationen geschützt.

In Folge dieser Ergebnisse lag es nahe die mit nativen Knorpeltransplantaten gewonnenen Erkenntnisse, unter Verwendung von in vitro präformierten Knorpeltransplantaten zu überprüfen. Hierzu wurde, nach den beschriebenen Techniken zur in vitro Herstellung von Knorpeltransplantaten, in vitro präformierter boviner Knorpel subkutan in thymusaplastische Nacktmäuse implantiert und nach 4 und 12 Wochen zur histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung wieder explantiert (H). Besonderes Interesse galt der im Vorfeld aufgekommenen Fragestellung, ob die PEC-Membran einen für die Differenzierung und Reifung der implantierten, noch unreifen Knorpelkonstrukte ausreichenden Nährstoffaustausch zulässt. Diese Bedenken konnten durch die Untersuchung gänzlich ausgeräumt werden. Es wurde im Vergleich zur Untersuchung mit nativem Knorpel eine vergleichbare peritransplantäre / perikapsuläre Fibrosebildung beobachtet, die den Differenzierungsstoffwechsel der in vitro präformierten Knorpelkonstrukte nicht negativ zu beeinflussen vermochte. Vielmehr zeigte sich, dass die PEC-Membran eine zellulär bedingte Transplantatalteration verhindern konnte, ohne hierbei die Vitalität der sich differenzierenden Knorpeltransplantate negativ zu beeinflussen. Bedingt durch die analog zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen erhaltenen Erkenntnisse, insbesondere im Hinblick auf zelluläre immunologische Mechanismen infolge der subkutanen Implantation, kam die Frage auf in wie fern die vor allem Makrophagen-vermittelte Frühreaktion beeinflusst werden könnte.

Subkutan implantiertes Gewebe wird generell vom Organismus erkannt und durch einen in einer Entzündungsreaktion gipfelnden Prozess affiziert. Dieser Mechanismus ist auch bei einer autologen Transplantation zu beobachten. Bedingt durch das chirurgische Trauma werden gerade in vitro präformierte Knorpelkonstrukte mit noch unvollständigem, perizellulärem Kollagengerüst und teils

frei zugänglichen Chondrozyten durch die Aktivierung einer komplexen Entzündungskaskade negativ beeinflusst. Dies führt zur Hemmung der Chondrozytendifferenzierung sowie zur Hemmung der Matrix- Neogenese und im Extremfall zum Untergang des Transplantates (78). Glukokortikoide können diese auf der Aktivierung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Serotonin beruhenden Effekte reduzieren sowie die Kapillardilatation und das hierauf normalerweise folgende Gewebeödem mit Leukozyteninfiltration und Fibrinablagerung in der Umgebung des Entzündungsherdens supprimieren. Weitere Mediatoren der Entzündungsreaktion wie zum Beispiel Prostaglandin-, Leukotrien- und Thromboxansekretion können ausreichend gehemmt werden. Darüber hinaus kommt es unter Glukokortikoidtherapie zu einer verminderten Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Glukokortikoide sind darüber hinaus durch weitere Effekte auf das Immunsystem (Hemmung Antigenrepräsentierender Zellen – APC; Reduzierte Expression von MHC Molekülen) effektive Immunmodulatoren.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine weitere tierexperimentelle Untersuchung unter Verwendung von Glukokortikosteroiden durchgeführt, mit der Erwartung, durch die Modulation des unspezifischen zellulären Immunsystems einen ausreichenden Schutz von in vitro präformierten Knorpelkonstrukten nach einer subkutanen Implantation zu ermöglichen (F). Methylprednisolon ist ein pharmakologisch gut bekannter und langjährig vielfältig verwendeter Vertreter dieser Substanzklasse mit einem definierten Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil.

Aurikulärer Kaninchenknorpel wurde in vitro aufgearbeitet und die hierdurch gewonnenen Chondrozyten nach einer zweimaligen Passagierung entweder in ein Fibrin- PGLA- PLLA- Co-Polymervlies mit und ohne Polyelektrolytkapsel oder in eine Agarosematrix eingebracht. Um eine auf die Fibrinmatrix gerichtete immunologische Reaktion auszuschließen wurde eine speziesspezifische Fibrinmatrix aus Kaninchenserum hergestellt und zur Anwendung gebracht. Die eine Hälfte der Versuchstiere wurde mit einer täglich absteigenden intramuskulären Methylprednisolondosis von 1mg/kg/KG über einen Zeitraum von 20 Tagen therapiert. Nach einer 6- und 12- wöchigen subkutanen Implantationsphase wurden die Transplantate entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die verkapselten Transplantate zeigten bereits nach 6 Wochen eine ausgeprägte fibröse Kapselbildung die nach 12 Wochen in vivo zu einer Degeneration des Knorpelgewebes führte. Die unverkapselten, nicht mit Methylprednisolon

behandelten Transplantate zeigten nach 6 Wochen eine deutliche inflammatorische zelluläre Komponente die nach 12 Wochen abgeklungen war und in einer partiellen Resorption der Transplantate mit vereinzelt Kalzifikationsarealen mündete. Die unverkapselten, mit Methylprednisolon behandelten Transplantate zeigten nahezu keine inflammatorische Komponente. Vielmehr wurde nach 6 Wochen eine trabekuläre Knochenbildung mit hämatopoetischen Markanteilen im Sinne einer metaplastischen Knochenbildung deutlich, die nach 12 Wochen neben Knorpelinseln stabil und deutlich nachweisbar blieb. Eine inflammatorische Komponente ließ sich auch nach 12 Wochen in vivo nicht nachweisen. Neben einer sicheren Protektion der Transplantate gegenüber einer frühen zellulären Entzündungsreaktion durch eine systemische, intramuskuläre Methylprednisolongabe zeigte die Untersuchung eine mit den bisher bekannten Erkenntnissen zur Knochenbildung und systemischer Kortikoidgabe nur schwer erklärbare metaplastische, ektopische, trabekuläre Knochenbildung die weiterer Untersuchungen bedarf.

**Eingebundene Publikationen des Kapitels**

**Haisch A**, Gröger A, Radke C, Ebmeyer J, Sudhoff H, Grasnick G, Jahnke V, Sittinger M

Macroencapsulation of human cartilage implants: polyelectrolyte complex membrane encapsulation.

Biomaterials. 2000;21(15):1561-66

**Haisch A**, Wanjura F, Radke C, Leder-Johrens K, Groger A, Endres M, Klaering S, Loch A, Sittinger M

Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2004;261(4):216-24

**Haisch A**, Gröger A, Gebert C, Leder K, Ebmeyer J, Sudhoff H, Jovanovic S, Sedlmaier B, Sittinger M

Creating artificial perichondrium by polymer complex membrane macroencapsulation: Immune protection and stabilization of subcutaneously transplanted tissue-engineered cartilage.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Apr;262(4):338-44

## 2.5. Biomechanische Eigenschaften von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben

*Haisch A, Duda GN, Schröder D, Gröger A, Gebert C, Leder K, Sittinger M*  
Morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue engineered human septal cartilage.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Dec;262(12):993-7

Duda GN, *Haisch A*, Endres M, Gebert C, Schroeder D, Hoffmann JE, Sittinger M.  
Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo.

J Biomed Mater Res. 2000;53(6):673-7

Die Charakterisierung von in vitro präformierten Knorpeltransplantaten durch histochemische und immunhistochemische Methoden erlaubt eine dezidierte Beschreibung der morphologischen Qualität. Bedingt durch den je nach klinischer Anwendung gewählten Implantationsort (Gelenk, Nase, Ohr) und die geforderten, lokoregionär spezifischen Eigenschaften stellt sich darüber hinaus die Frage nach der biomechanischen Qualität in vitro präformierter Transplantate. Hierzu finden sich Untersuchungstechniken die auf einer Beschreibung der Steifigkeit (YOUNG-Modulus) und der maximalen Versagenslast mittels einer Materialprüfmaschine nach ZWICK beruhen (105, 106).

In einer ersten Untersuchung sollte die Frage geklärt werden inwiefern die biomechanischen Eigenschaften in vitro präformierter Knorpelgewebe vergleichbare biomechanische Eigenschaften im Vergleich zu nativen, lokoregionär unterschiedlichen Knorpelgeweben (Gelenk, Nase) bieten. Hierzu wurde boviner Gelenkknorpel in vitro aufgearbeitet und die isolierten, amplifizierten Gelenkchondrozyten in einem Fibrin- PGLA- Polymerkonstrukt inkubiert und für einen Zeitraum von 6 und 12 Wochen subkutan in die Rückenregion thymusaplastischer Nacktmäuse implantiert (C). Die biomechanische Qualität wurde anhand einer ZWICK- Materialprüfmaschine unter Erhebung der maximalen Bruchlast und der Steifigkeit durch den YOUNG- Modulus charakterisiert und mit den biomechanischen Eigenschaften humanen nativen Septumknorpels und bovinen Gelenkknorpels

verglichen. Die biomechanisch untersuchten Transplantate wurden nach der Untersuchung histologisch aufgearbeitet und morphologisch beschrieben. Nach 6 und 12 Wochen in vivo erschienen die explantierten Transplantate makroskopisch von solider und elastischer Konsistenz. In der biomechanischen Untersuchung zeigten die 12- Wochen Transplantate sowohl im YOUNG- Modulus als auch in der maximalen Versagenslast bessere Eigenschaften als die 6- Wochen Vergleichsgruppe. Die mechanische Steifheit des reinen Polymervlieses war unter der Messgrenze des Testaufbaus. Nach 12 Wochen konnten keine Unterschiede in den Messparametern zwischen den in vitro präformierten Transplantaten und humanen nativen Septumknorpeltransplantaten gemessen werden. Bemerkenswert hierbei erscheint der Umstand, dass die Standarddeviation der untersuchten humanen Septumknorpelstücke größer als die Standarddeviation der bovinen, in vitro präformierten, subkutan implantierten Transplantate war. Die maximale Versagenslast und die elastische Komponente der untersuchten bovinen nativen Knorpelstücke lagen deutlich höher als die Parameter des humanen nativen Septumknorpels. Der YOUNG- Modulus und die maximale Versagenslast der in vitro präformierten Transplantate lagen lediglich auf einem Niveau von 25-30% der Parameter nativen bovinen Gelenkknorpels. Die histologische Beschreibung der Transplantatmorphologie zeigte ein knorpeltypisches Erscheinungsbild, wobei sich nur geringe Unterschiede zwischen den 6- und 12- Wochen Transplantaten zeigten. Die perizelluläre Matrix erschien in den 12- Wochen Transplantaten dichter als in den 6- Wochen Transplantaten. Die Alcian- Blau Färbung war durchweg homogen als Hinweis auf eine Präsenz von Glukosaminoglycanen. Die Masson- Goldner Färbung zeigte ebenfalls ein homogenes Verteilungsmuster als Hinweis auf eine homogene Kollagenformation. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt konnten Polymerfaserbestandteile als Hinweis auf eine vollständige Resorption der Fasern detektiert werden.

Die Untersuchung erlaubt den Schluss, dass in vitro präformierter, subkutan implantierter boviner Gelenkknorpel nahezu die gleichen biomechanischen Eigenschaften bietet wie nativer humaner Septumknorpel. Allerdings liegen deren biomechanische Eigenschaften nur auf einem Niveau von 25-30% der biomechanischen Eigenschaften von bovinem nativem Gelenkknorpel, sodass eine klinische Anwendung dieses Modells im mechanisch belasteten Gelenkbereich wenig sinnvoll erscheint.

Nun lag es Nahe in einer weiteren Untersuchung die biomechanischen Eigenschaften in vitro präformierter humaner Septumknorpeltransplantate im Vergleich zu humanem nativem Septumknorpel zu untersuchen (I). Hierzu wurde humaner Septumknorpel in vitro aufgearbeitet und nach einer Amplifikationsphase in eine Fibrin- PGLA- Polymermatrix eingebracht und für 6 und 12 Wochen in die Rückenregion thymusaplastischer Nacktmäuse implantiert. Die makroskopische und histologische Morphologie ergab ein knorpeltypisches Erscheinungsbild mit Hinweis auf eine homogene Knorpelmatrix in Form einer Mukopolysaccharid- und Kollagenmatrix. Die biomechanischen Parameter maximale Versagenslast und Steifigkeit zeigten nach 6 Wochen in vivo etwas niedrigere Werte und erreichten nach 12 Wochen in vivo die Werte von humanem nativem Septumknorpel. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung kann davon ausgegangen werden, dass die mit der beschriebenen Methodik hergestellten Knorpeltransplantate nach 12 Wochen ausreichende, mit nativem Knorpel vergleichbare biomechanische Eigenschaften besitzen und für eine Anwendung in der plastisch- rekonstruktiven Chirurgie geeignet sind.

### **Eingebundene Publikationen des Kapitels**

**Haisch A**, Duda GN, Schröder D, Gröger A, Gebert C, Leder K, Sittinger M  
Morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue  
engineered human septal cartilage.  
Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Dec;262(12):993-7

Duda GN, **Haisch A**, Endres M, Gebert C, Schroeder D, Hoffmann JE, Sittinger M.  
Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in  
vivo.  
J Biomed Mater Res. 2000;53(6):673-7

## 2.6. Biostimulation von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben mittels niedrig intensivem Ultraschall

Duda GN, Kliche A, Kleemann R, Hoffmann JE, Sittinger M, *Haisch A*

Does low-intensity ultrasound stimulation increase maturation of tissue engineered cartilage?

J Biomed Mater Res. 2004;15(68B)(1):21-8

Basierend auf Untersuchungen zum Knochenwachstum und zur Frakturheilung die eine Stimulation der Knochenheilung durch die Anwendung von gepulstem, niedrig intensivem Ultraschall beschreiben, wurde ein Versuchsaufbau gewählt der die biomechanischen und morphologischen Eigenschaften in vitro präformierter, subkutan implantierter Knorpeltransplante untersucht (107-110). Boviner Gelenkknorpel wurde in vitro aufgearbeitet und in mehreren Passagen amplifiziert. Nach einer dreidimensionalen Anordnung der isolierten Chondrozyten in einer Fibrin-PGLA- Fasermatrix wurden die Transplantate subkutan in die Rückenregion thymusaplastischer Nacktmäuse für insgesamt 12 Wochen implantiert, wobei die Hälfte der Transplantate täglich für 20 Minuten niedrig intensivem gepulstem Ultraschall ausgesetzt wurde und die andere Hälfte unbehandelt als Kontrollgruppe diente. Die Transplantate wurden nach 1, 3, 6 und 12 Wochen explantiert und histologisch aufgearbeitet sowie mittels RT-PCR charakterisiert (G). Der YOUNG-Modulus erhöhte sich stetig von der 3. bis zur 12. Implantationswoche und war ab der 6. Woche vergleichbar mit dem YOUNG-Modulus von nativem Gelenkknorpel, wobei sich keine relevanten Unterschiede zwischen behandeltem und unbehandeltem in vitro präformiertem Knorpel zeigte. Die histologische Untersuchung zeigte eine homogene Neoknorpelbildung. Die mit niedrig intensen, gepulsten Ultraschall behandelten Transplantate zeigten in der RT-PCR in der 1. Woche eine deutlich reduzierte Kollagen I Expression im Vergleich zu den Transplantaten vor der Implantation, nach 8 Tagen in vitro Inkubation in einem Bioreaktor. Weiterhin zeigte sich im Verlauf eine geringe, aber signifikante Reduktion der Kollagen I und II Expression im Vergleich zu den unbehandelten Knorpeltransplantaten. Darüber hinaus waren die behandelten Knorpeltransplantate nach 6 und 12 Wochen in vivo signifikant weniger Steif als nativer Knorpel.

Die Untersuchung lässt den Schluss zu, dass niedrig intensiver, gepulster Ultraschall keine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften in vitro präformierter, subkutan implantierter Knorpelgewebe bedingt, sondern vielmehr zu einer Verschlechterung der morphologischen Eigenschaften im Vergleich zu nativem Knorpel führt. Eine Anwendung von niedrig intensivem, gepulstem Ultraschall zur Verbesserung der Reifung von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpeltransplantaten erscheint daher nicht sinnvoll.

**Eingebundene Publikationen des Kapitels**

Duda GN, Kliche A, Kleemann R, Hoffmann JE, Sittinger M, **Haisch A**

Does low-intensity ultrasound stimulation increase maturation of tissue engineered cartilage?

J Biomed Mater Res. 2004;15(68B)(1):21-8

### **3. Diskussion**

#### **3.1. Entwicklung eines für die Biosynthese von Knorpelzellen optimierten bioresorbierbaren Trägermatrixmodells**

Die Herstellung autologer Knorpeltransplantate mit Hilfe des Tissue Engineerings bietet die Möglichkeit vitales Gewebe in entsprechendem Umfang für plastisch-rekonstruktive Eingriffe bereitzustellen. Ein entscheidender Schritt in der Umsetzung dieser Technik wurde mit der Verwendung vernetzter, resorbierbarer biokompatibler Polymervliese getätigt. Diese Faserstrukturen bieten eine hohe mechanische Festigkeit und eine maximal große interne, homogene Oberfläche bei geringem Materialanteil. Nachteilig hierbei erscheint die Beobachtung, dass nach Einbringen von Chondrozyten in vernetzte Polymervliese, abhängig von der Faserdichte und den gewählten Oberflächenbeschichtungen, die dreidimensionale Chondrozytenverteilung stark differiert (30, 111, 112). Eine homogene dreidimensionale Chondrozytenverteilung bildet jedoch die Voraussetzung für die Produktion einer stabilen homogenen Knorpelmatrix (33, 113). Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, das phänotypische Erscheinungsbild von isolierten Chondrozyten in einem vernetzbaren Fibrinverband und das Verhalten des Fibrin-Chondrozytenverbandes in Verbindung mit einem formstabilen, resorbierbaren Polymervlies zu untersuchen und zu beschreiben.

Fibrin findet in der operativen Medizin seit nunmehr 20 Jahren eine breite Anwendung. Daten zur klinischen Anwendung, Biokompatibilität, Infektionssicherheit, Resorptionsdauer und zum immunologischen Verhalten liegen in ausreichendem Umfang vor (114, 115). Frisch entnommene native Chondrozyten bleiben in vernetztem Fibrin vital und zeigen den für Knorpel spezifischen Phänotyp (116). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die in Monolayerkultur vermehrten, dedifferenzierten Chondrozyten, nach Einbringen in ein dreidimensionales fibrinvernetztes Gel, knorpelspezifische Bestandteile wie Kollagen II und Proteoglycane bilden. Gleichzeitig ließ sich eine über 14 Tage stabile homogene dreidimensionale Verteilung im retikulären Fibringerüst nachweisen. Diese Ergebnisse ließen sich auch in Kombination der Zell- Fibrinmatrix mit resorbierbarem Polymervlies über einen Zeitraum von 6 Wochen reproduzieren. Während dieser

Kulturzeit kam es unter der Degradation des fibrinvernetzten Gels zur Ausbildung eines kompakten Knorpelgrundgerüsts. Immunhistochemisch konnten knorpelspezifische Bestandteile wie Kollagen II und Proteoglycane nachgewiesen werden. Die begrenzte mechanische Stabilität des vernetzten Fibrins bietet bei der Kombination mit einem Polymervlies den Vorteil, dass initial eine stabile Einbettung und homogene Zellverteilung im Polymervlies erreicht werden kann. Dies ist besonders bei einer inhomogenen Faserdichte der Polymervliese von Wichtigkeit. Parallel zur Degradation und Auflockerung des Fibrinverbandes kommt es zur Ausbildung einer Knorpelmatrix und zur Verfestigung der Knorpel-Polymervliesstruktur. Das in dieser Untersuchung verwendete Polymervlies zeigte gegen Ende der Kulturzeit starke Degradationserscheinungen. Wichtig erscheint hierbei, dass der Zeitraum zwischen der Degradation des Fibrinnetzes nach 7 - 14 Tagen und der Ausbildung einer Knorpelmatrix, zur Stabilisierung der homogenen dreidimensionalen Verteilung der Chondrozyten, überbrückt werden muss. Hierzu erscheint eine 6-wöchige Stabilität des Polymervlieses vollkommen ausreichend.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse liegt der Schluss nahe, fibrinvernetzte Gele in Kombination mit resorbierbaren, formbaren Polymervliesen als dreidimensionales formbares Grundgerüst für die Herstellung autologer Knorpelgewebe zu verwenden. Die nach wie vor kontrovers diskutierte Infektionssicherheit industriell gefertigter Fibrinpräparate kann durch den Einsatz autologer Fibrinpräparate erheblich erhöht werden. Diese bieten die gleichen biomechanischen Eigenschaften wie industriell gefertigte Präparate (117). Ein weiterer Vorteil autologer Fibrinpräparate liegt in der Vermeidung immunologischer Reaktionen. Mit dem in dieser Untersuchung beschriebenen Modell bietet sich erstmals die Grundlage, in vitro hergestellte autologe vitale Knorpeltransplantate unter ausschließlicher Verwendung biokompatibler Komponenten in eine klinische Anwendung zu übertragen.

Neben der Entwicklung eines auf resorbierbaren Biomaterialien basierenden Kulturmodells besteht die Notwendigkeit insbesondere bei kleinen, anatomisch unkompliziert geformten Gewebedefekten eine möglichst sichere, wenn überhaupt nur gering mit dem Empfängergewebe interagierende Herstellungsmethode für die Knorpelneogenese zu wählen. Hierfür bieten sich 'High density' Kulturen an. In einer weiteren dargestellten Arbeit wurde das morphologische Verhalten von porcinen, aurikulären Chondrozyten in einem 'High density' Kulturmodell untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: (1) Aurikuläre Chondrozyten

proliferieren bis zur vierten Passage unter Verlust ihrer knorpeltypischen Differenzierung, wobei die Chondrozyten die Fähigkeit zur Redifferenzierung behalten und nach Einbringen in eine 'High density' Kultur die Produktion knorpeltypischer Proteine innerhalb weniger Tage wieder aufnehmen. (2) Zellen der Passagen P5-P7 redifferenzieren in 'High density' Kulturen im Gegensatz dazu unvollständig oder gar nicht. Vielmehr zeigen die Zellen mit zunehmender Passageanzahl Anzeichen von Apoptose unter Expression apoptosetypischer Marker. (3) Diese irreversibel dedifferenzierten Chondrozyten exprimieren matrixabbauende und proinflammatorische Enzyme.

Ältere Untersuchungen konnten zeigen, dass artikuläre und elastische Chondrozyten in einer nur wenige Tage dauernden Monolayerkultur vollständig zu fibroblastenähnlichen Zellen dedifferenzieren (33, 118-120). Es ist gut bekannt, dass Zell-Zellkontakte während der ersten Phase der Chondrozytendifferenzierung in der Chondrogenese eine entscheidende Rolle spielen. Diese Phase wird auch als Zellkondensationsphase bezeichnet (121). Diese Phase wurde auch in frühen Phasen von 'High density' Chondrozytenkulturen beobachtet (122, 123). So führt die Hemmung der  $\beta$ 1- Integrin- Kollagen Interaktion zum Tod von Chondrozyten (124) und die Hemmung von  $\beta$ 1- Integrin durch Integrin Antikörper zur Hemmung der Chondrogenese (125). In dieser Untersuchung konnten wir das Adhäsionsmolekül  $\beta$ 1- Integrin von aurikulären Chondrozyten in 'High density' Kulturen während der ersten 5 Passagen (P0-P4) nachweisen. Darüber hinaus spielen Integrine eine wichtige Rolle im MAP- kinase Pathway bezüglich Zellüberleben und Differenzierung.

Matrixmetalloproteinasen spielen beim Matrixstoffwechsel und insbesondere bei der Matrixdegeneration eine wichtige Rolle, in dem sie unter physiologischen Bedingungen extrazelluläre Matrixbestandteile abbauen. Daher wurde in dieser Untersuchung die Expression spezifischer Metalloproteinasen mittels Western Blot untersucht. Die Expression von MMP-1, MMP-9 und MMP-13 ist im osteoarthritischen Knorpel erhöht (126). Eine erhöhte Expression von MMP-9 und MMP-13 konnte auch in der vorliegenden Untersuchung in höheren Passagen nachgewiesen werden und als Ausdruck des stetig zunehmenden Zelluntergangs und der irreversiblen Dedifferenzierung gewertet werden. Der Entzündungsmediator Cyclooxygenase-2 (COX-2) führt im osteoarthritischen Knorpel zur Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und einer Zunahme der Entzündungsreaktionen mit folgender Knorpelschädigung. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Untersuchung

die COX-2 Expression während der verschiedenen Passagen bestimmt. Auch hier zeigte sich in zunehmendem Masse eine Zunahme der COX-2 Expression mit steigender Passageanzahl, als Ausdruck der durch den Zelluntergang vermittelten Matrixdegeneration infolge des Zelluntergangs und der hierdurch bedingten Entzündungsreaktion.

Fasst man die Ergebnisse der Untersuchung zusammen, so liegt der Schluß nahe, dass das hier untersuchte 'High density' Kulturmodell eine gute Grundlage für die Redifferenzierung von in Monolayer amplifizierten Chondrozyten bildet, wenn eine maximale Passageanzahl von 5 Passagen (P0-P4) berücksichtigt wird. Das vorgestellte Modell eignet sich vor allem für die Rekonstruktion von anatomisch begrenzten wenig komplexen Strukturen. Für die Rekonstruktion größerer, komplex geformter Strukturen sind Zellkulturmodelle unter Verwendung von Biomaterialien die erste Wahl.

### **3.2. Entwicklung einer vollständig autologen Fibrinmatrix für die Herstellung von in vitro präformierten Knorpelgeweben**

So lag es nahe den entwickelten Ansatz unter Verwendung von Fibrin und einer Polymerfasermatrix weiter zu verfolgen und zu optimieren. Um die Nachteile und Risiken von kommerziell verfügbaren auf gepooltem Plasma basierenden Fibrinkleberprodukten zu vermeiden, ist ein vollständig autolog hergestelltes Produkt wünschenswert. In den USA war bis zum Jahr 1998 die Verwendung von gepooltem Plasma für die Herstellung von Fibrinogen verboten. Erst die Verwendung hochsensitiver Virustestsysteme durch die kommerziellen Anbieter erlaubte die Einführung derartiger Produkte, allerdings zu einem hohen Marktpreis von durchschnittlich 400 US\$/ml. Dennoch arbeiten gerade aus Kostengründen viele Kliniken in den USA mit autologen, im eigenen Haus hergestellten Fibrinprodukten. Allerdings wird hierbei lediglich die Fibrinogenkomponente autolog hergestellt. Die Thrombinkomponente wird nach wie vor kommerziell bezogen und basierte anfänglich auf bovinem gepooltem Plasma. So war es nicht verwunderlich, dass gerade bei wiederholter Anwendung von bovinem Thrombin durch die Bildung von Antikörpern immunologische Nebenwirkungen mit teils fatalem Ausgang auftraten (127, 128). So wurde im Jahr 1990 bovines Thrombin verboten und durch humanes Thrombin aus gepoolten Plasmaquellen ersetzt. Der in dieser Untersuchung verwendete Ansatz zur Herstellung eines autologen Fibrinklebers verfolgte durch die streng autologe Herstellung beider Kleberkomponenten einen konsequenten Ansatz, da schon durch die Verwendung nur einer Kleberkomponente, die aus gepoolten Quellen herrührt, ein fakultatives Infektionsrisiko besteht. Ziel der Untersuchung war also die kostengünstige und qualitativ hochwertige Herstellung beider Kleberkomponenten auf einer autologen Basis. Die Präparation von autologen Fibrinogen ist eine gut entwickelte, in der Klinik weit verbreitete Methode (129). Fibrinogen kann in konzentrierter Form aus humanem Plasma durch Kryopräzipitation oder durch Präzipitation unter Verwendung verschiedener Verbindungen/Substanzen wie z.B. Ammoniumsulfat, Polyethylen, Glycol, Ether und Glycin gewonnen werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde aufgrund der Einfachheit die Methode der Kryopräzipitation verwendet. Die Herstellung der Thrombinkomponente erfolgte nach der modifizierten Methode nach Heystek (98)

unter Verwendung einer Ionenaustauschchromatographie. Das hierdurch erhaltene native Thrombin ist bei Raumtemperatur instabil und muß durch die Zugabe von Glycin und Glukose stabilisiert werden (130). Die Daten dieser Untersuchung zeigen, dass es mit dieser Methode möglich ist hohe Konzentrationen von Thrombin aus 200 ml Fresh-Frozen-Plasma zu erhalten. Die Thrombinaktivität lag zwischen 51 NIH/ml und 414 NIH/ml was mit der Thrombinaktivität kommerzieller Produkte vergleichbar ist (4-500 NIH). Thrombin ist notwendig für die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin und bestimmt über die Aktivität die Geschwindigkeit des Polymerisationsprozesses. Eine ausreichende Polymerisation um ein Fibrinklumpchen zu bilden ist ab einer Konzentration von 1 NIH/ml möglich (131). Für die Anwendung im Tissue Engineering spielt die Modifikation der Thrombinaktivität eine wichtige Rolle, da hierdurch die Zellverteilung und die Formgebung des Transplantates beeinflusst werden kann. Durch Plasmapherese wird eine individuelle Spende von bis zu 600 ml Plasma möglich. Das durch den Extraktionsprozeß erhaltene Fibrinogen ist reich an Morphogenen und unterstützt den Knorpelmetabolismus sowie die Bildung von Kollagen II und Proteoglycanen (132). Als nützliches Nebenprodukt kann das verbleibende Plasma nach Extraktion der Gerinnungsfaktoren als Kulturmedium verwendet werden. Durch die beschriebenen Methoden ist es möglich eine vollständig autologe Fibrinmatrix herzustellen ohne das Risiko einer viralen Übertragung und immunologischer Nebenwirkungen. Verglichen mit kommerziellen Produkten ist diese Methode kostengünstig und in der Qualität vergleichbar. Für eine funktionelle Qualitätsbestimmung sind weitere Untersuchungen bezüglich der biomechanischen Eigenschaften autologer Fibrinkleber notwendig.

### **3.3. Formgebung und subkutane Implantation von dreidimensionalen, in vitro präformierten Knorpelgeweben im Tiermodell der thymusaplastischen Nacktmaus**

Die Formgebung erscheint beim Tissue Engineering in der Kopf- Halsregion von besonderer Wichtigkeit. So stellen die anatomisch komplex geformten Strukturen in dieser Region hohe Anforderungen an die kosmetischen und funktionellen Voraussetzungen eines in vitro präformierten Transplantates. Diese Formgebung muß von einem möglichst degradierbaren Biomaterial für den Zeitraum, bis eine ausreichend stabile Knorpelmatrix aufgebaut wurde, gewährleistet werden. In vorausgegangen Arbeiten zur Entwicklung eines Trägermaterialmodells für die dreidimensionale Anheftung von Chondrozyten wurden die Vor- und Nachteile einzelner, bekannter Biomaterialien diskutiert und es hat sich gezeigt, dass die Kombination einer faserartigen, dreidimensional stabilen Trägermatrix in Form von Polymervliesen und einer gelartigen, homogenen Trägermatrix aus Fibrin bezüglich der verschiedenen Anforderungen optimal erscheinen. Polymerfaservliese garantieren eine vorübergehende Stabilität der vorgegebenen, zu rekonstruierenden anatomischen Form und die Fibrinklebermatrix sorgt für eine homogene dreidimensionale Zellverteilung. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen in vivo die Formation von knorpeltypischer perizellulärer Matrix wie Kollagen II und Proteoglycanen, wobei jederzeit eine homogene Zellverteilung innerhalb des Transplantates gewährleistet ist. Die grobe Beurteilung der Knorpelstabilität erscheint dem von nativem Knorpel zu entsprechen. Für die Formgebung der Transplantate wurde die anatomisch aufwendig geformte Struktur der Ohrmuschel gewählt, da die Rekonstruktion des äußeren Ohres für den plastisch rekonstruktiven Chirurgen seit je her als eine große Herausforderung gilt (6-10, 14, 133-140). Zum Zeitpunkt der Untersuchung gab es nur vereinzelt Publikationen die sich mit der Formgebung von in vitro präformierten Knorpeltransplantaten beschäftigten. Keine dieser Arbeitsgruppen hatte bis dahin die Formgebung einer Ohrmuschel vorgenommen, wobei im selben Jahr nahezu zeitgleich zu der hier diskutierten Untersuchung, Arbeiten zweier US-amerikanischer Arbeitsgruppen publiziert wurden (41, 141, 142). Diese Arbeitsgruppen hatten jedoch unterschiedliche Ansatzpunkte bezüglich der verwendeten Trägermaterialien gewählt. Zum einen eine Polymerfaserstruktur und

zum anderen eine injizierbare Gelmatrix. Keine der Arbeitsgruppen hatte den hier beschriebenen Weg einer Kombination beider Trägerstrukturen gewählt und die Untersuchungen mit animalischen Chondrozyten vorgenommen. In dieser Untersuchung wurden im Gegensatz dazu, in enger Anlehnung an spätere klinische Anwendung, humane Chondrozyten verwendet und die Formbarkeit des Biomaterials untersucht. So wurde basierend auf der beschriebenen Methode ein nach einer Ohrmuschel geformtes Knorpeltransplantat hergestellt. Hierzu wurde von einem gesunden humanen Ohr ein Abdruck genommen und darauf basierend eine Silikonhohlform erstellt in die Polymerfasern und die Fibrinmatrix eingebracht und darauf folgend mit humanen Chondrozyten besiedelt wurden.

Aufgrund der Größe einer humanen Ohrmuschel wurde im Tiermodell der thymusaplastischen Nacktmaus auf eine vollständige Ohrmuschelimplantation verzichtet. Stattdessen wurde das Ohrmuschelgerüst in anatomische Untereinheiten zerteilt und für 6 Wochen in die Rückenregion von thymusaplastischen Nacktmäusen subkutan implantiert. Parallel dazu wurden Transplantatanteile *in vitro* kultiviert. Beide Bedingungen erlaubten die Reifung des Knorpels im Sinne einer Knorpelmatrixbildung, allerdings mit unterschiedlicher Ausprägung. So zeigten die *in vitro* kultivierten Transplantate eine deutlich geringere perizelluläre Knorpelmatrixbildung als die *in vivo*, subkutan kultivierten Transplantate. Dieser Umstand könnte die fehlende Stabilität über die Zeit von *in vitro* kultivierten Transplantaten erklären, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die initial Stabilität gebende Polymermatrix über die Zeit resorbiert wurde und die nur in geringer Ausprägung vorhandene neu gebildete Knorpelmatrix diese Anforderung nicht erfüllen konnte. Neben diesem Umstand bietet die *in vitro* Kultur die Gefahr einer iatrogenen Verkeimung und den dadurch bedingten Untergang des Transplantates. Das vorgestellte Knorpelkulturmodell bestätigt die Vorteile der zuvor entwickelten Vorgehensweise unter Verwendung zweier unterschiedlicher Biomaterialien, die *in vitro* mit Chondrozyten besiedelt und *in vivo* zur Ausreifung einer Knorpelmatrix führen, bei gleichzeitiger sicherer Formgebung und deren Erhalt während der Ausreifung der Knorpelmatrix.

### **3.4. Protektion von in vitro präformierten, subkutan implantierten, dreidimensionalen Knorpelgeweben durch Makroverkapselung und Immunmodulation**

Die in den vorangegangenen Untersuchungen gemachten Beobachtungen bezüglich der Integration und Ausreifung von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpeltransplantaten in der thymusaplastischen Nacktmaus ließen schnell erkennen, dass die noch unreifen Knorpeltransplantate nach Implantation, vor allem während der ersten Phase der Wundheilung, einer Alteration durch entzündliche Prozesse ausgesetzt sind. Hierdurch bedingt kommt es zur Beeinträchtigung der Formgebung und im Extremfall zum Untergang und vollständigen Resorption des Transplantates. Die Probleme der Resorption und Alteration von Transplantaten finden sich auch bei der klassischen Methode der heterotopen Knorpeltransplantation im Kopf-Halsbereich wie z.B. die Ohr-, Trachea- und Nasenrekonstruktion, aber auch in der Mittelohrchirurgie und dem Verschluss von Nasenseptumperforationen. Aber auch andere Fachdisziplinen bedienen sich der autologen Transplantation wie z. B. in der Augenheilkunde bei der Rekonstruktion des Oberlides (143-145). Um eine Affektion des Transplantates zu verhindern wurde nach Protektionsmethoden gesucht die eine vorübergehende Protektion des Transplantates nach der Implantation in das Transplantatlager gewährleisten. In den letzten 20 Jahren wurden vielfache Anstrengungen unternommen den Schutz von Zellen in vitro und in vivo durch eine Verkapselung zu ermöglichen. Eine dieser Methoden bedient sich der Applikation von alginatbeschichteten Poly-L-Lysin (ALG/PLL) und stellte sich als eine der viel versprechendsten Methoden dar (102). Diese Methode wurde ständig weiterentwickelt und so wurden synthetische Analoga von Alginat entwickelt um den Hauptnachteil dieser Substanz zu vermeiden, die fehlende qualitative Reproduzierbarkeit während des Herstellungsprozesses, bei dem Alginat aus Seealgen extrahiert wird (146). Dennoch stellt die Herstellung von ALG/PLL einen komplexen und aufwendigen Vorgang dar. Eine alternative aber bisher recht unbekannt Methode wurde von Dautzenberg unter Verwendung einer Polyelektrolytkomplexmembran (PECM) entwickelt. Die PECM kann in einer unaufwendigen 'Ein-Schritt' Prozedur durch die Verwendung zweier gegensätzlich geladener Polyelektrolyte (Natriumcellulosesulfat/ NaCs und Polydiallyldiammoniumchlorid/ PDADMAC) hergestellt werden. Hierzu werden die

sich in nicht toxischen, wäßrigen Lösungen befindenden Polyelektrolyte auf das zu verkapselnde Gewebe gegeben, woraus eine homogene Verkapselung des Gewebes resultiert. Diese Membran stellt infolge des Cut-off von 20 000 Dalton eine Immunbarriere dar, da ein direkter Zellkontakt mit dem Empfängerorganismus vermieden wird. Obwohl die PECM Kapsel selbst eine immunologische Reaktion hervorruft, ist diese verglichen mit einer ALG/ALL Kapsel deutlich geringer. Riecker berichtet in diesem Zusammenhang über den Untergang von Pankreas-Inselzellen aufgrund einer fibrösen Kapselbildung infolge der Immunreaktion auf die ALG/PLL Kapsel (147).

In der vorliegenden Untersuchung wurden native humane Septumknorpelstücke (1 x 1 x 0,5 cm) subkutan mit und ohne PECM Kapsel in die Rückenregion thymusaplastischer Nacktmäuse für 1, 4, 8 und 16 Wochen implantiert und nach diesen Zeiträumen zur histologischen und rasterelektronen- mikroskopischen Untersuchung aufgearbeitet. Die Transplantate mit den verkapselten Transplantaten zeigte eine leichte fibrotische Kapselbildung an der Außenseite der PECM Kapsel. Zeichen eines insuffizienten Transplantatmetabolismus oder gar ein Transplantatuntergang konnte nicht beobachtet werden. Zwar ist der Stoffwechsel von adultem Knorpel sehr gering im Vergleich zu stoffwechselaktiven Pankreas-Inselzellen, dennoch zeigt sich adulter Knorpel sehr empfindlich gegenüber externen Einflüssen. Die unverkapselten Transplantate hingegen zeigten deutliche Anzeichen von Alteration in Form von Kalzifikation und Nekrose in Folge einer immunologischen Reaktion des Host-Organismus auf den Operations- und Transplantatstimulus. Eine Alteration zeigten die verkapselten Transplantate nur an den Stellen wo die Kapselmembran vermutlich durch den chirurgischen Implantationsprozess unterbrochen war.

Diese Beobachtungen ließen eine weitere Untersuchung der PECM Kapsel unter Verwendung von in vitro präformierten Knorpeltransplantaten sinnvoll erscheinen. So wurden in einer weiteren Untersuchung bovine Gelenkchondrozyten nach der zuvor beschriebenen Methode in eine Polymervlies- Fibrinmatrix eingebracht und subkutan in die Rückenregion von thymusaplastischen Nacktmäusen für 4 und 12 Wochen implantiert. Vor der Implantation und vor der Verkapselung der einen Untersuchungsgruppe mit einer PECM Kapsel wurden die Transplantate in vitro für 4 Tage kultiviert. Nach den genannten Implantationszeiträumen wurden die Transplantate explantiert und histologisch sowie rasterelektronenmikroskopisch

untersucht. Beide Untersuchungsgruppen demonstrierten, dass in vitro präformierter Knorpel in vivo differenziert und eine extrazelluläre Knorpelmatrix bildet, wobei sich deutliche Unterschiede bezüglich der Matrixbildung und der das Transplantat umgebenden Immunreaktion zwischen den beiden Untersuchungsgruppen zeigten.

Nach 4 Wochen konnte bei den unverkapselten Transplantaten eine Reduktion der Transplantatgröße bedingt durch eine Akkumulation von dicht gepackten Phagozyten an der Oberfläche der Transplantate beobachtet werden. Diese beeinflussen die Matrixbildung, den Chondrozytenmetabolismus und die Fibrindegradation. Im Kontrast hierzu kompensieren die verkapselten Transplantate die Fibrindegradation durch den Aufbau einer knorpeltypischen Matrix, wobei die Transplantatkapsel wie eine mechanische Barriere das Transplantat vor äußeren Einflüssen schützt. Nach 12 Wochen in vivo waren die nicht verkapselten Transplantate von Makrophagen infiltriert und von Fremdkörperriesenzellen umgeben. In weiten Teilen der Transplantate war die Knorpelmatrix infolge der Entzündungsreaktion durch fibröses Bindegewebe ersetzt. Obwohl die Untersuchung aufgrund der xenogenen Gewebe in einem thymusaplastischen Nacktmausmodell mit nicht funktionstüchtigem T-zellgetriggerten Immunreaktionen durchgeführt wurden, konnte innerhalb und in der Umgebung der Transplantate Makrophagen und Monozyten sowie zu späteren Zeitpunkten Fremdkörperriesenzellen beobachtet werden. Hierbei spielen die Fremdkörperriesenzellen eine besondere Rolle da sie Reste von Polymerfasern inkorporiert hatten und eine besondere Rolle des verwendeten Biomaterials bei der Entzündungsreaktion vermuten lassen. In diesem Zusammenhang berichten Cao et al. über eine milde chronische Entzündungs- und Fremdkörperreaktion bei der Verwendung von PGLA- PLLA- Polymerfasern für das Tissue engineering von Knorpel im Tiermodell (148). Britt et al. konnten ähnliche Beobachtungen beschreiben (149). Sie vermuteten eine zusätzlich zu normalen Wundheilungsprozessen auftretende, durch die im sauren Milieu stattfindende, verzögerte Degradation der Polymerfasern stimulierte, zellvermittelte Entzündungsreaktion mit Makrophagen, Fibroblasten und Histozyten. Mittlerweile ist bekannt dass durch verschiedene Polymere Makrophagen, Monozyten und Interleukin 1 sowie TNF- $\alpha$  aktiviert werden und in einer chronischen Fremdkörperreaktion münden können (150, 151). Darüber hinaus ist bekannt, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin die Proteoglycan-, Aggrecan- und Kollagensynthese hemmen (152). Diese Immunreaktionen könnten für die beobachtete Knorpelresorption und den partiellen Knorpelumbau in

unverkapselten Transplantaten verantwortlich sein. Bedingt durch den Cut-off der Kapsel von 20 000 Dalton können zelluläre immunologische Reaktionen im Inneren oder an der unmittelbaren Oberfläche von noch unreifen Knorpeltransplantaten vermieden werden. Eine kapselbedingte beziehungsweise durch das Operationstrauma hervorgerufene Entzündungsreaktion kann hierdurch nicht verhindert werden. Auch können Zytokine und Morphogene die Kapselmembran passieren und bedingt die Knorpelneogenese negativ beeinflussen.

Die beschriebene Verkapselung von in vitro präformierten, zur Implantation vorgesehenen Knorpeltransplantaten zeigte in den beschriebenen Untersuchungen gute, ermutigende Ergebnisse und geben Anlass diese Technik für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe auch in Zukunft weiter zu entwickeln. Bedingt durch patentrechtliche Einschränkungen und der Auflösung des die PECM Kapsel entwickelnden Institutes für Polymerchemie in Potsdam stand die Technik jedoch für weitergehende Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Wie bereits diskutiert bedingen Operationstrauma und Biomaterialien eine zellvermittelte Entzündungsreaktion nach der Implantation von in vitro präformierten Knorpeltransplantaten. Glukokortikoide können die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Serotonin sowie die Kapillardilatation mit folgendem Gewebeödem und Fibrinablagerung reduzieren. Darüber hinaus finden eine Verminderung der Prostaglandin- und Thromboxanfreisetzung sowie eine Verringerung der zellulären Reaktion in Form von Makrophagen und neutrophilen Zellen statt. Diese Wirkung wird auch als antiphlogistischer Effekt bezeichnet und findet Ausdruck in einer Unterbrechung der Funktion antigenpräsentierender Zellen (APC) und einer reduzierten Expression von MHC Molekülen. Vor dem Hintergrund dieser Kenntnisse wurde eine Untersuchung durchgeführt die das Überleben und die Differenzierung von in vitro präformierten aurikulären Knorpeltransplantaten unter systemischer Gabe von Methylprednisolon im Kaninchenmodell beschreiben sollte. Methylprednisolon ist ein pharmakologisch gut bekannter und langjährig vielfältig verwendeter Vertreter dieser Substanzklasse mit einem definierten Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil.

Aurikulärer Kaninchenknorpel wurde in vitro aufgearbeitet und die hierdurch gewonnenen Chondrozyten nach einer zweimaligen Passagierung entweder in ein Fibrin- PGLA- PLLA- Polymervlies mit und ohne Polyelektrolytkapsel oder in eine Agarosematrix eingebracht. Um eine auf die Fibrinmatrix gerichtete immunologische

Reaktion auszuschließen wurde eine speziesspezifische Fibrinmatrix aus Kaninchenserum hergestellt und zur Anwendung gebracht. Die eine Hälfte der Versuchstiere wurde mit einer täglich absteigenden intramuskulären Methylprednisolondosis von 1mg/kg/KG über einen Zeitraum von 20 Tagen therapiert. Nach einer 6- und 12- wöchigen subkutanen Implantationsphase wurden die Transplantate entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die verkapselten Transplantate zeigten bereits nach 6 Wochen eine ausgeprägte fibröse Kapselbildung die nach 12 Wochen in vivo zu einer Degeneration des Knorpelgewebes führte. Die unverkapselten, nicht mit Methylprednisolon behandelten Transplantate zeigten nach 6 Wochen eine deutliche inflammatorische, zelluläre Komponente die nach 12 Wochen abgeklungen war und in einer partiellen Resorption der Transplantate mit vereinzelt Kalzifikationsarealen mündete. Die unverkapselten, mit Methylprednisolon behandelten Transplantate zeigten nahezu keine inflammatorische Komponente. Vielmehr wurde nach 6 Wochen eine trabekuläre Knochenbildung mit hämatopoetischen Markanteilen im Sinne einer metaplastischen Knochenbildung deutlich, die nach 12 Wochen neben Knorpelinseln stabil und deutlich nachweisbar blieb. Eine inflammatorische Komponente ließ sich auch nach 12 Wochen in vivo nicht nachweisen.

Neben einer sicheren Protektion der Transplantate gegenüber einer frühen zellulären Entzündungsreaktion durch eine systemische, intramuskuläre Methylprednisolongabe zeigte die Untersuchung eine mit den bisher bekannten Erkenntnissen zur Knochenbildung und systemischer Kortikoidgabe nur schwer erklärbare metaplastische, ektopye Knochenbildung die weiterer Untersuchungen bedarf. In dieser Untersuchung führte die Methylprednisolonbehandlung zu einer Knochenbildung in der mit Methylprednisolon behandelten Untersuchungsgruppe. In der unbehandelten Untersuchungsgruppe konnte eine Dedifferenzierung der Chondrozyten und eine Kalzifikation, jedoch keine Knochenbildung beobachtet werden. Die Kalzifikation könnte durch die Nekrose und die unspezifische Entzündung sowie durch das Tiermodell an sich erklärt werden. Die deutliche trabekuläre Knochenbildung in der behandelten Untersuchungsgruppe läßt sich hingegen nicht so einfach erklären. Einige Erklärungsmöglichkeiten finden sich in einer möglichen Interaktion von Methylprednisolon und dem sauren Milieu das durch die Faserdegradation hervorgerufen wird sowie der ektopen Implantation von aurikulären Chondrozyten und zuletzt auch im Tiermodell an sich. Die gemachten

Beobachtungen stellen jedoch auch die Frage nach der Auswahl eines geeigneten Immunmodulators, hier in Form von Methylprednisolon. Diese Entscheidung basiert unter anderem auf einer Publikation die eine Überlebensverlängerung von autologen Composite grafts unter perioperativer und postoperativer Methylprednisolongabe beschreibt und diese in Relation zur Gabe eines Cyclooxygenase/Lipooxygenasehemmers setzt (153). Hoch dosierte Glukokortikoidanwendungen haben im Tiermodell zu Nebenwirkungen wie Osteonekrose geführt (154). Einige Aspekte der hier vorgestellten Untersuchung stehen im Gegensatz zu Erkenntnissen im Hinblick auf eine Knochenregeneration. So wurde im Kaninchenmodell bei der Behandlung von ulnaren Knochendefekten, bei einer systemischen Applikation von Methylprednisolon in der Dosierung von 1mg/kg/KG, eine Unterdrückung der Knochenregeneration beobachtet (155). In einer weiteren Publikation wurde beschrieben, dass das Wachstum langer Röhrenknochen im Kaninchentiermodell unter einer täglichen systemischen Applikation von Methylprednisolon in einer Dosierung von 4 mg und 16 mg/kg/KG abnahm (156). Gleichlautende Ergebnisse führte eine weitere Publikation bezüglich des apositionellen Knochenwachstums im Kaninchentiermodell an (157). So gelten Kortikosteroide generell als Hemmer der Knochenbildung wodurch diese Eigenschaft Eingang in die Beschreibung des Nebenwirkungsprofils von Kortikosteroiden gefunden hat. Vielmehr werden Kortikosteroide klinisch angewendet um die ektopische Knochenformation zu hemmen (158).

Andererseits werden Kortikosteroide in der Zellkultur für die Differenzierung von Chondrozyten und die Bildung von Knochen ausgehend von Stammzellen herangezogen (159). Letztendlich lassen sich die durch die vorliegende Arbeit aufgeworfenen Fragen nicht aufklären sondern bedürfen vielmehr weiterer Untersuchungen. Die Frage ob sich die entzündliche Reaktion und deren negativer Einfluß auf die implantierten in vitro präformierten Knorpeltransplantate durch die systemische Behandlung mit Methylprednisolon eindämmen läßt, kann hingegen durch die vorliegende Arbeit eindeutig beantwortet und bestätigt werden.

### **3.5. Biomechanische Eigenschaften von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben**

Nachdem in den vorangegangenen Arbeiten eine morphologische Beurteilung der Qualität von in vitro präformierten und subkutan implantierten Knorpeltransplantaten durch histochemische, immunhistochemische, molekularbiologische und elektronenmikroskopische Verfahren dargestellt wurde, blieb die Frage nach der biomechanischen Qualität bis dahin unbeantwortet. Knorpelgewebe wird dem Bindegewebe- und Stützapparat zugeordnet und so stellt die Beurteilung der biomechanischen Eigenschaften einen wichtigen Parameter dar, nicht nur für die Beurteilung biomechanisch stark belasteter Strukturen wie die Gelenkregion, sondern auch für die Beurteilung der Funktionalität von Knorpelstützstrukturen wie der Ohrmuschel und der Trachea.

Bis zur Publikation der ersten Untersuchung im Jahre 2000 lagen keine weiteren Untersuchungen zur biomechanischen Qualität in Form von Steifigkeit und maximaler Versagenslast von in vitro hergestellten Knorpeltransplantaten vor. In einer ersten Untersuchung wurde boviner Gelenkknorpel nach dem beschriebenen Verfahren in vitro präformiert und subkutan in die Rückenregion von thymusaplastischen Nacktmäusen für 6 und 12 Wochen implantiert. Als Kontrolle fungierten nativer boviner Gelenkknorpel und nativer humaner Nasenseptumknorpel. Nach 6 und 12 Wochen wurden die Transplantate zur biomechanischen Untersuchung explantiert.

Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Transplantate beschrieb eine knorpeltypische Neomatrix nach 6 und 12 Wochen in vivo. Während der Implantationsperiode zeigte sich eine zunehmende Homogenität der perizellulären Kollagenmatrix wobei die in den vorangegangenen Diskussionen angemerkten randständigen fibrösen Veränderungen durch entzündliche Prozesse auch hier zu beobachten waren, es jedoch in keinem Fall zu einem Transplantatuntergang kam. Die Untersuchungen demonstrierten erstmalig, dass die biomechanischen Eigenschaften von in vitro präformierten bovinen Gelenkknorpeltransplantaten mit den biomechanischen Eigenschaften von nativem humanem Nasenseptumknorpel vergleichbar sind. Die biomechanischen Eigenschaften von nativem bovinem Gelenkknorpel wurden nicht erreicht, vielmehr lagen die Messwerte deutlich darunter. Die signifikante Zunahme der biomechanischen Eigenschaften zwischen den 6 und

12 Wochen implantierten Transplantaten kann mit der in diesem Zeitraum zunehmenden perizellulären Kollagenmatrix erklärt werden. Diese Erklärung erscheint um so plausibler, wenn man den Umstand betrachtet, dass an den Polymerfaservliesen, die den Transplantaten initial Stabilität verliehen hatten, mit den angewandten Meßtechniken keine vergleichbaren Daten zur Steifigkeit erhoben werden konnten. Nach 6 und 12 Wochen waren darüber hinaus histologisch keine Faserbestandteile mehr nachweisbar. Die Untersuchungsergebnisse demonstrieren, dass die vorgestellten Meßtechniken basierend auf einer Materialtestmaschine nach ZWICK unter Verwendung eines Stempeleindruckverfahren, ein ausreichend sensitives Meßverfahren für die Beurteilung der Knorpelqualität und dessen Differenzierungsgrades darstellt. Dabei stellt das Stempeleindruckverfahren ein komplexes Verfahren aus mehreren mechanischen Parametern dar. Die Biphasentheorie beschreibt die Materialeigenschaften durch die Elastizität und die Entspannung der soliden Phase, als auch durch Flüssigkeitsbewegungen (160). Die Steifigkeit basiert auf der Beschreibung des YOUNG- Modulus durch die Formel nach HAYES die von ZHANG modifiziert wurde (161, 162). Basierend auf der beschriebenen Technik und den in einer ersten Untersuchung mit bovinem Knorpel erhaltenen Ergebnissen erschienen im Hinblick auf eine klinische Anwendung weitere Untersuchungen sinnvoll.

So wurde in einer weiteren Untersuchung humaner Nasenseptumknorpel nach den beschriebenen Verfahren in vitro präformiert und für 6 und 12 Wochen subkutan in die Rückenregion von thymusaplastischen Nacktmäusen implantiert. Die histologische Untersuchung zeigte in beiden Gruppen nach 6 und 12 Wochen in vivo eine knorpeltypische Morphologie im Sinne einer Neoknorpelbildung, charakterisiert durch reife Chondrozyten, Mukopolysaccharide und Kollagen. Die biomechanische Untersuchung, nach dem gleichen Versuchsaufbau wie in der zuvor durchgeführten Untersuchung, beschrieb dass die biomechanischen Eigenschaften von in vitro präformiertem Nasenseptumknorpel denen von nativem humanen Nasenseptumknorpel entsprechen. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungsergebnissen die Rotter in 2002 an humanem Nasenseptumknorpel erhoben hatte (26, 163). Die in der hier diskutierten Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben darüber hinaus einen weiteren Parameter, die maximale Versagenslast, untersucht, da die Versagenslast in bestimmten anatomischen Regionen wie dem Ohr oder dem knorpeligen Nasenstützgerüst einen wichtigen

qualitativen Faktor darstellt. Bezüglich der Untersuchungsparameter Steifigkeit und maximale Versagenslast konnte zwischen den Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede beschrieben werden, wobei die Werte der 6 Wochen Gruppe geringgradig niedriger als die Werte der 12 Wochen Gruppe waren. Dies könnte als Hinweis auf die auch in der zuvor durchgeführten Untersuchung gemachten Beobachtungen gesehen werden, dass die Knorpelmatrixbildung in der 6 Wochen Gruppe noch nicht so weit wie in der 12 Wochen Gruppe fortgeschritten war (69). Die geringe Standardabweichung der Meßwerte innerhalb der 12 Wochen Gruppe könnte als Hinweis auf eine standardisierte, qualitativ hochwertige Herstellungsmethode der in vitro präformierten Transplantate gewertet werden. Die dargestellte Untersuchung kann jedoch keine Aussagen bezüglich der biomechanischen Langzeiteigenschaften treffen, da der Untersuchungszeitraum auf 12 Wochen begrenzt wurde. Ältere Arbeiten zu biomechanischen Eigenschaften in vitro präformierter Knorpelgewebe hatten Daten lediglich an in vitro nicht vermehrten, animalischen Chondrozyten erhoben und hierbei einen anderen biomechanischen Versuchsaufbau verwendet (164). In der hier diskutierten Arbeit wurde bewußt die erste Phase des biphasischen Modells gemessen, da hierbei die in vivo Situation von Knorpel in der plastisch rekonstruktiven Chirurgie deutlicher abgebildet wird (160).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass durch die hier diskutierten Untersuchungen wichtige Daten zur biomechanischen Qualität boviner und humaner, in vitro präformierter, subkutan implantierter Knorpelgewebe dargestellt und in Relation zur Morphologie und deren zeitlichen Entwicklung in vivo, sowie in Relation zu nativen Knorpelgeweben im Gelenk- und Nasenseptumbereich gesetzt werden.

### **3.6. Biostimulation von in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpelgeweben mittels niedrig intensivem Ultraschall**

Die bis dahin durchgeführten Untersuchungen legen dar, dass in vitro präformierter Knorpel in vivo nach subkutaner Implantation zur Ausreifung kommt, aber insbesondere während der frühen Phase nach der Implantation, solange sich die Knorpelmatrix noch im Abbau befindet, durch entzündungsbedingte, zelluläre Immunprozesse alteriert wird. Eine Stimulation der Knorpelreifung könnte schneller zu einer knorpeltypischen Matrix führen und die externen Einflüsse minimieren. Niedrig intensiver, gepulster Ultraschall kann die Geweberegeneration durch eine Beschleunigung der entzündlichen Antwort anregen, insbesondere während der initialen Phase der Wundheilung (165, 166). In zahlreichen experimentellen und klinischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass niedrig intensiver, gepulster Ultraschall die Frakturheilung und das Knochenwachstum stimuliert (107-109, 167). Vor dem Hintergrund, dass der Umfang der Expression von knorpeltypischen Proteinen die mechanische Stabilität beeinflusst, erscheinen Arbeiten die einen Einfluß von niedrig intensivem, gepulstem Ultraschall auf die Expression von knorpeltypischen Proteinen in Chondrozyten, Osteoblasten und Fibroblastenzellkulturen beschreiben, als sehr bedeutsam (167-171).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese formuliert, dass niedrig intensiver, gepulster Ultraschall in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpel stimuliert und die Bildung von knorpeltypischer Matrix unterstützt. So wurden die Aufgaben der Untersuchung wie folgt formuliert. Morphologische und biomechanische Untersuchung der Knorpelreifung von in vitro präformierten bovinen, artikulären Knorpeltransplantaten nach subkutaner Implantation, durch Bildung zweier Untersuchungsgruppen die mit und ohne niedrig intensive Ultraschallstimulation für 1, 3, 6 und 12 Wochen in vivo verbleiben.

Die makroskopischen und die histologischen Untersuchungen offenbarten zwischen den beiden Untersuchungsgruppen zu den Zeitpunkten 6 und 12 Wochen keine Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild. Vielmehr zeigten sich wie in den vorherigen Untersuchungen nur geringe Unterschiede in der Dichte und Homogenität der perizellulären Matrix zwischen den Untersuchungszeitpunkten 6 und 12 Wochen. Des weiteren wurde eine randständige Affektion der Transplantate

mit fibrösem Umbau beschrieben. Nach 12 Wochen waren keine Polymervliesfaserreste erkennbar. Die biomechanische Untersuchung offenbarte keinen signifikanten Vorteil der mit Ultraschall behandelten Untersuchungsgruppe gegenüber der unbehandelten Gruppe. Vielmehr zeigten sich unerwartete Ergebnisse die das Gegenteil belegen. Unabhängig von einer Ultraschallbehandlung lag eine stetige Zunahme des YOUNG-Modulus über die Wochen 3 und 6 bis zur 12. Woche vor. Nach 3 Wochen lagen die Werte der Steifigkeit in der unbehandelten Untersuchungsgruppe bei den Werten nativer artikulärer Gewebe. Im Gegensatz hierzu zeigten die Werte der mit Ultraschall behandelten Transplantate zu den Zeitpunkten 6 und 12 Wochen in vivo statistisch relevant niedrigere Werte für den Young-Modulus als die nativen Kontrollgewebe. Obwohl die mechanische Qualität über die Zeit zunahm, konnten die mit Ultraschall behandelten Transplantate die Werte von nativem Knorpelgewebe nicht erreichen. Das stand im klaren Gegensatz zu den Daten der unbehandelten Transplantate die bereits nach 3 Wochen die mechanische Qualität der nativen Gewebe erreicht hatten. In der RT-PCR Analyse zeigte sich analog zu den biomechanischen histologischen Ergebnissen kein Vorteil der Ultraschallstimulation. Die Kollagen I, Kollagen II und TGF- $\beta$ 1 Expression war zwischen den Untersuchungsgruppen vergleichbar. Obwohl sich in den biomechanischen und histologischen Untersuchungen der sich 3 und 6 Wochen in vivo befindenden Transplantate ein Hinweis auf eine zunehmende Knorpelmatrixbildung ergeben hatte, zeigten die Expressionsmuster der genannten Proteine keine Unterschiede zu diesen Zeitpunkten. Vielmehr zeigte sich bei den mit Ultraschall behandelten Transplantaten ein reduziertes Expressionsverhalten für Kollagen I und II im Vergleich zur unbehandelten Untersuchungsgruppe nach der ersten Untersuchungswoche. TGF- $\beta$ 1 scheint in der mit Ultraschall behandelten Untersuchungsgruppe geringgradig, jedoch statistisch nicht relevant niedriger exprimiert zu sein. Die in der mit Ultraschall behandelten Untersuchungsgruppe im Vergleich zur unbehandelten Untersuchungsgruppe reduzierte Kollagen I und Kollagen II Expression und zu einem geringeren Grad auch die reduzierte TGF- $\beta$ 1 Expression scheint eine Stimulation der Knorpelreifung auszuschließen, ja sogar auf eine Inhibition hinzudeuten. Im Vergleich zur Kollagen I Expression vor der Implantation fand sich nach einer einwöchigen Implantation eine Erniedrigung der Kollagen I Expression.

Diese Ergebnisse korrelieren mit Beschreibungen, die eine in Monolayer während der Zellvermehrung erhöhte Kollagen I Expression und nach dreidimensionaler Zellanordnung eine Reduktion der Kollagen I Expression beschreiben (172, 173). Hinweise wie die gegensätzlichen Erkenntnisse zu den in Zellkulturen durch Ultraschallapplikation beobachteten Zellstimulationen erklärt werden könnten, finden sich womöglich im unterschiedlichen Versuchsaufbau der Untersuchungen. In der hier diskutierten Untersuchung wurden mittels Tissue Engineering Techniken aufgearbeitete Chondrozyten dreidimensional in einem Biomaterial angeordnet und in ein Tiermodell subkutan implantiert. So regt in vitro Ultraschall die Proliferation von Chondrozyten an. In vivo ist jedoch eine Differenzierung und eben keine Proliferation gefordert, so dass man davon ausgehen muß, dass durch die Ultraschallbehandlung ein gegenteiliger, für die Differenzierung nachteiliger Effekt bewirkt wurde. Eine Erklärung der Diskrepanzen zu Untersuchungen die eine Stimulation der chondrogenen Komponente der Kallusheilung oder gar des Knochenwachstums und der Frakturheilung durch Ultraschall beschreiben, ist mit dieser Argumentation jedoch nicht möglich (107-109, 167, 170).

## 4. Zusammenfassung

Im Jahr 1991 beschreiben und verwenden die Gebrüder Vacanti vom MIT in Boston, USA erstmalig den Begriff Tissue Engineering (174). Gefolgt von einer populärwissenschaftlichen Publikation in der eine Maus, die auf dem Rücken ein nach einer humanen Ohrmuschel geformtes Transplantat trägt, dargestellt ist, wird im Jahr 1993 von Langer und Vacanti ein Übersichtsartikel mit dem Titel 'Tissue engineering' in Science publiziert (25). Hierdurch wird ein neues Kapitel der Medizin aufgeschlagen, das seitdem Mediziner und Wissenschaftler aller Fachrichtungen beschäftigt und das durch die Einführung des Begriffes 'Regenerative Medizin', der die Erweiterung dieses Forschungsgebietes bis in die heutigen Tage beschreibt, umfassender charakterisiert wird.

Schon in den Anfängen weit vor der Verwendung des Begriffes Tissue Engineering haben Ärzte versucht Gewebe zu regenerieren und für die klinische Anwendung verfügbar zu machen. So hat bereits im Jahr 1970 Green, ein Orthopäde am Childrens Hospital in Boston, Chondrozyten auf einer Knochenspänematrix angesiedelt und diese in Nacktmäuse implantiert. Obwohl sein Vorhaben erfolgreich war, zog er den Schluß, dass erst mit der Entwicklung und Einführung von entsprechenden Biomaterialien eine erfolgreiche Weiterentwicklung dieses Verfahrens und die Einführung dieser Methode in die klinische Anwendung ermöglicht werden würde (175). Diese Vermutung ist auf den physiologischen Eigenschaften von Chondrozyten begründet, da je nach Umgebung in der sich Chondrozyten befinden, diese ihren Phänotyp und den Zellstoffwechsel ändern. So befinden sich adulte Chondrozyten innerhalb einer reifen Knorpelgrundmatrix, die aus Kollagenen, Proteo- und Glukosaminoglykanen und Chondroitinsulfat besteht, in einem physiologischen 'steady state' mit einer nur sehr geringen Proliferation und einem sehr begrenzten Zellstoffwechsel. Isoliert man hingegen Chondrozyten aus ihrem Matrixverband und bringt sie in eine zweidimensionale Monolayerzellkultur, so ändern sie ihren Phänotyp und ihren Stoffwechsel. Sie zeigen einen spindelförmigen Phänotyp und eine verstärkte Proliferation. Die Kollagenproduktion begrenzt sich auf die Kollagene I und III. Reorganisiert man Chondrozyten in einer dreidimensionalen Anordnung, so ändern sie erneut ihren Phänotyp in eine rundlich- ovale Form und reduzieren die Proliferation. Nach kurzer Zeit beginnen die Zellen mit der Bildung von

Kollagen I, II und X und bauen eine neue perizelluläre Knorpelgrundmatrix auf. Diesen Umstand macht man sich im Tissue Engineering zu nutze, indem man eine kleine Knorpelbiopsie aus dem Organismus entnimmt, die Chondrozyten aus der Matrix auf enzymatischem Weg isoliert und dann in vitro in Monolayerkultur vermehrt. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl werden die Chondrozyten in ein dreidimensionales Gerüst eingebracht und die Knorpelreifung induziert.

In einer Untersuchung unter Verwendung eines 'high density' Kulturmodells konnte nachgewiesen werden, dass Chondrozyten bis zur fünften Passage die Fähigkeit zur Redifferenzierung behalten und eine knorpeltypische Matrix unter Expression von Kollagen II, Proteoglycan und  $\beta$ -1 Integrin bilden. Chondrozyten späterer Passagen verlieren diese Fähigkeit mit zunehmender Passagezahl und zeigen Anzeichen des apoptotischen Zelltodes was sich im Western Blot in einer Expression von Caspase, MMP- 9 und MMP- 13 sowie COX- 2 darstellte. Diese Ergebnisse wurden in Relation zu transmissionselektronischen Beschreibungen der Chondrozytenkulturen gebracht. Da diese Erkenntnisse nur zögerlich aufgegriffen und umgesetzt wurden, lag vor allem an dem Problem, dass Biomaterialien die sich hierfür eignen zuerst identifiziert oder gegebenenfalls erst entwickelt werden mußten.

In den ersten Arbeiten wurde daher das Hauptaugenmerk auf die Identifikation von bioresorbierbaren, biokompatiblen Biomaterialien gelegt, die sich für eine dreidimensionale und stabile Anordnung von Chondrozyten eignen. Bedingt durch die besonderen Anforderungen in der plastisch rekonstruktiven Chirurgie, die neben einer homogenen stabilen Zellverteilung auch eine Formbarkeit und ausreichende Formstabilität von Biomaterialien erwarten, wurde eine Kombination aus zwei unterschiedlichen Biomaterialien, ein Fibringel und ein Polylactid-Polyglycolidfaservlies, gewählt und deren Performance im Tierversuch evaluiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten deutlich, dass die gewählten Materialien alle Anforderungen erfüllen und eine Neoknorpelbildung in vitro ermöglichen. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen wurde schon von Beginn an vornehmlich mit humanem Knorpelgewebe gearbeitet, was insbesondere im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung von besonderem Interesse war. Dazu war es notwendig die tierexperimentellen Untersuchungen mit thymusaplastischen Nacktmäusen durchzuführen. Diese hatten sich aufgrund eines defekten T- und B-zellulären Immunsystems als geeignet für xenogene Transplantationsuntersuchungen von in vitro präformierten Geweben erwiesen. In

weiteren Untersuchungen wurden Anstrengungen unternommen komplex geformte und an anatomische Strukturen, wie beispielsweise der Ohrmuschel angepaßte Gewebe, herzustellen und deren Verhalten im Tiermodell zu überprüfen. Hierbei konnten wichtige Informationen und Erfahrungen für eine spätere klinische Anwendung, insbesondere im Hinblick auf die formgenaue Herstellung von Knorpelgeweben gesammelt werden. Allerdings zeigte sich schon sehr zeitig, dass die Transplantate nach subkutaner Implantation alteriert und im Extremfall vollständig resorbiert wurden. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Autoren die die Performance von in vitro präformierten Knorpel im Gelenkbereich beschreiben. Im Gelenkbereich findet man nur in begrenztem Umfang Vorgänge die eine Alteration oder einen Untergang des implantierten, unreifen Knorpels herbeiführen. Es wurde vermutet dass im Subkutanbereich bedingt durch das chirurgische Trauma und durch Biomaterialdegradationsprodukte die zu einer Milieuänderungen in den sauren pH- Bereich führen, physiologische Entzündungsprozesse unterhalten und sogar verstärkt werden. Infolge der primär zellulären Entzündung und den hierbei freigesetzten Mediatoren werden der Chondrozytenstoffwechsel und der Knorpelmatrixaufbau negativ beeinflusst.

In einer weiteren Arbeit konnte ein Verfahren zur vollständig autologen Herstellung autologer Fibrinkleber etabliert werden um die Risiken einer Infektion und speziesspezifischen, fibrinkleberbedingten immunologischen Reaktionen ausschließen zu können.

Erst die Verwendung einer protektiven, das Transplantat einhüllenden Polyelektrolytkomplexmembran konnte die Alteration oder den vollständigen Untergang nativer Knorpeltransplantate während einer subkutanen Implantation sicher verhindern. In deren Folge wurden Untersuchungen angestellt die die Membranverkapselung auch an in vitro präformierten, subkutan implantierten Knorpeltransplantaten überprüfen sollten. Es konnte eindrucksvoll dargestellt werden, dass sich in vitro präformierte Knorpeltransplantate durch eine Polyelektrolytkomplexmembran ausreichend schützen lassen und eine Neomatrixbildung ermöglicht wird. Aufgrund von logistischen Problemen konnte diese viel versprechende und erfolgreich angewendete Verkapselungstechnik jedoch zum damaligen Zeitpunkt nicht weiterentwickelt werden.

Eine weitere Methode zur Protektion der Transplantate konnte in einer Untersuchung zur systemischen Behandlung der Transplantatempfängertiere mit Methylprednisolon

evaluiert werden. Hierbei wurde in einem autologen Tiermodell aurikulärer Kaninchenknorpel untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sich Glukokortikoide für die Transplantatprotektion subkutan implantierter Knorpelgewebe eignen. Entgegen hinreichend bekannter Wirkprofile und in experimentellen Arbeiten gewonnenen Informationen zur Interaktion von Glukokortikoiden mit Knorpel-Knochengeweben, wurde in der hier vorgestellten Arbeit durch die Methylprednisolonbehandlung eine trabekulären Knochenbildung induziert. Mögliche Erklärungsversuche stützen sich auf den Umstand einer heterotopen Transplantation, die Verwendung von degradierbaren Biomaterialien und das Tiermodell an sich. Die offenen Fragen wurden im Rahmen dieser Habilitationsschrift nicht weiter verfolgt, da diese außerhalb des Fokus der hier vorgestellten Arbeit lagen.

Vielmehr mußte die Frage geklärt werden, inwiefern die morphologisch beschriebene Qualität den funktionellen Anforderungen in den entsprechenden Empfängerregionen wie Ohrmuschel, Nase und Trachea gerecht werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die biomechanischen Parameter `maximale Versagenslast` und `Steifigkeit` von nativem Gelenk- und Nasenseptumknorpel mit den biomechanischen Parametern von *in vitro* präformiertem, subkutan implantierten bovinen Gelenkknorpel und in einer weiteren Untersuchung von humanem Nasenseptumknorpel erhoben. Es zeigte sich, dass der über die Zeit zu beobachtende Matrixaufbau mit der Zunahme der biomechanischen Eigenschaften korreliert. Bemerkenswert erschien, dass die Parameter des Polymerfaservlieses allein weit unterhalb der zu einem späteren Zeitpunkt meßbaren Werte für *in vivo* kultivierte Knorpelgewebe blieb. Vielmehr ließen sich die Parameter von *in vitro* präformiertem Nasenseptumknorpel und bovinem Gelenkknorpel mit denen von nativem humanem Nasenseptumknorpel vergleichen. Die Werte von nativem bovinem Gelenkknorpel konnten hingegen nicht erreicht werden.

Aufgrund von experimentellen Untersuchungen die einen stimulatorischen Effekt von niedrig intensivem, gepulstem Ultraschall auf Chondrozyten, Osteoblasten und Fibroblasten beschreiben und aufgrund von klinischen Untersuchungen in denen eine Beschleunigung des Knochenwachstums und der Frakturheilung beschrieben wird, wurde in einer weiteren experimentellen Arbeit der Effekt von niedrig intensivem, gepulstem Ultraschall auf *in vitro* präformierte, subkutan implantierte Knorpeltransplantate untersucht. Hierbei wurde offenbar, dass eine

Ultraschallstimulation nicht den gewünschten Effekt erzielt. Vielmehr konnte durch biomechanische, morphologische und molekularbiologische Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Ultraschallbehandlung die Knorpelreifung in vivo hemmt und die Methode für eine Verbesserung der Knorpelreifung nicht geeignet ist. Derzeit werden Untersuchungen, die nicht Inhalt dieser Arbeit sind, durchgeführt, die einerseits die Eignung von neuartigen Biomaterialien und andererseits den Einfluß von Morphogenen auf in vitro Kulturen untersuchen. Darüber hinaus sind Untersuchungen unter Verwendung der weiterentwickelten Polyelektrolytkapseltechnologie in Vorbereitung.

Obwohl im Jahr 2000, basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Herstellungstechniken und Erkenntnissen unter Verwendung von autologem Fibrinkleber, erstmalig die chirurgische Rekonstruktion eines Ohrmuschelteildefektes durch Ärzte der Klinik für Plastische Chirurgie in Freiburg vorgenommen wurde, ist die Rekonstruktion von Subkutangewebedefekten der Kopf- Halsregion bis dato nicht möglich. Dies äußerte sich auch in den Ergebnissen der Freiburger Arbeitsgruppe und begründet sich durch die im Vergleich zur Gelenkregion andersartigen Gewebestruktur und die deutliche immunologische Situation im Subkutangewebe. So stellt sich die, basierend auf einer postoperativen Entzündungsreaktion auftretende Transplantatalteration, mit Beeinträchtigung der biomechanischen und morphologischen Knorpelqualität, als Hauptproblem und Kontraindikation für eine klinische Anwendung dar. Derzeitige Forschungsanstrengungen zielen auf die Optimierung von Biomaterialien sowie die Verwendung von Vorläuferzellen, wodurch bereits in vitro eine ausreichende Knorpelmatrixsynthese ermöglicht werden soll, um bei einer später folgenden Implantation eine geringe Angriffsfläche für die postoperativen immunologischen Prozesse zu bieten.

## 5. Abkürzungen

ALG/PLL	Alginat/Polylysin- Methode
APC	Antigen-Presenting-Cell
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
COX	Cyclooxygenase
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
NaCs	Natriumcellulosesulfat
PDADMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
PEC-Membran	Polyelektrolyt-K(C)omplex-Membran
PGLA	Polyglycolid
PLLA	Poly-L-lactid
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Chain-Reaction
TGF- $\beta$ 1	Transforming-Growth-Factor-Beta 1

## 6. Tierversuchsgenehmigungen

Für die Versuche, die in Berlin an den Tierexperimentellen Einrichtungen der Charite Campus Virchow und Campus Benjamin Franklin als verantwortlicher Versuchsleiter durchgeführt wurden, lagen die Genehmigungen H 0135/96, H 0151/98 und H 0092/99 sowie H 0002/00 der lokalen Behörden (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit; Berlin) vor.

## 7. Verzeichnis der eingebundenen Publikationen

- A. Haisch A, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M  
Tissue-engineering of human cartilage for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin- and polymerfleece structures.  
HNO. 1996;44:624-29
- B. Haisch A, Gröger A, Radke C, Ebmeyer J, Sudhoff H, Grasnick G, Jahnke V, Sittinger M  
Macroencapsulation of human cartilage implants: polyelectrolyte complex membrane encapsulation.  
Biomaterials. 2000;21(15):1561-66
- C. Duda GN, Haisch A, Endres M, Gebert C, Schroeder D, Hoffmann JE, Sittinger M  
Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo.  
J Biomed Mater Res. 2000;53(6):673-7
- D. Haisch A, Loch A, David J, Pruß A, Hansen R, Sittinger M  
Preparation of an completely autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering.  
Med Biol Eng Comput. (Cell Eng). 2000;38(6):686-89
- E. Haisch A, Klaring S, Groger A, Gebert C, Sittinger M  
A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants.  
Eur Arch Otorhinolaryngol. 2002;259(6):316-21

- F. Haisch A, Wanjura F, Radke C, Leder-Johrens K, Groger A, Endres M, Klaering S, Loch A, Sittinger M  
Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes.  
Eur Arch Otorhinolaryngol 2004;261(4):216-24
- G. Duda GN, Kliche A, Kleemann R, Hoffmann JE, Sittinger M, Haisch A  
Does low-intensity ultrasound stimulation increase maturation of tissue engineered cartilage?  
J Biomed Mater Res. 2004;15(68B)(1):21-8
- H. Haisch A, Gröger A, Gebert C, Leder K, Ebmeyer J, Sudhoff H, Jovanovic S, Sedlmaier B, Sittinger M  
Creating artificial perichondrium by polymer complex membrane macroencapsulation: Immune protection and stabilization of subcutaneously transplanted tissue-engineered cartilage.  
Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Apr;262(4):338-44
- I. Haisch A, Duda GN, Schröder D, Gröger A, Gebert C, Leder K, Sittinger M  
Morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue engineered human septal cartilage.  
Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005 Dec;262(12):993-7
- J. Haisch A, Marzahn U, Mobasheri A, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M  
Development and phenotypic characterization of a high density in vitro model of auricular chondrocytes with applications in reconstructive plastic surgery.  
Histol Histopathol. 2006;21:467-476

## 8. Literaturverzeichnis

1. Hartig GK ER, Telian SA. Comparison of the chondrogenic potential of free and vascularized perichondrium in the airway. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:9-15.
2. Hammer C, Bujia J. [Immunology of vital and preserved transplants]. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1992;1:3-26.
3. Rettinger G. [Autogenous and allogeneic cartilage transplants in head and neck surgery (excluding middle ear and trachea)]. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1992;1:127-62.
4. Kastenbauer ER. [Preservation and application possibilities of allogenic (homologous) transplants in the ear, nose and throat region]. *HNO* 1983;31(11):371-80.
5. Rudderman RH, Guyuron B, Mendelsohn G. The fate of fresh and preserved, noncrushed and crushed autogenous cartilage in the rabbit model. *Ann Plast Surg* 1994;32(3):250-4.
6. Nagata S. Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part I. Grafting the three-dimensional costal cartilage framework for lobule-type microtia. *Plast Reconstr Surg* 1994;93(2):221-30; discussion 67-8.
7. Nagata S. Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part II. Grafting the three-dimensional costal cartilage framework for concha-type microtia. *Plast Reconstr Surg* 1994;93(2):231-42; discussion 67-8.
8. Nagata S. Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part III. Grafting the three-dimensional costal cartilage framework for small concha-type microtia. *Plast Reconstr Surg* 1994;93(2):243-53; discussion 67-8.
9. Weerda H. Reconstructive surgery of the auricle. *Facial Plast Surg* 1988;5(5):399-410.
10. Weerda H. Classification of congenital deformities of the auricle. *Facial Plast Surg* 1988;5(5):385-8.
11. Niparko JK, Langman AW, Cutler DS, Carroll WR. Tissue-integrated prostheses in the rehabilitation of auricular defects: results with percutaneous mastoid implants. *Am J Otol* 1993;14(4):343-8.

12. Nagata S. Total auricular reconstruction with a three-dimensional costal cartilage framework. *Ann Chir Plast Esthet* 1995;40(4):371-99; discussion 400-3.
13. Weerda H, Siegert R. Complications in otoplastic surgery and their treatment. *Facial Plast Surg* 1994;10(3):287-97.
14. Brent B. Technical advances in ear reconstruction with autogenous rib cartilage grafts: personal experience with 1200 cases. *Plast Reconstr Surg* 1999;104(2):319-34; discussion 35-8.
15. Okumura N, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Ikada Y, Shimizu Y. Experimental reconstruction of the intrathoracic trachea using a new prosthesis made from collagen grafted mesh. *Asaio J* 1994;40(3):M834-9.
16. Browdie DA, Bernstein RV, Johnson R. Materials for tracheoplasty: which work? which are best? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113(4):810.
17. Gates GA, Tucker JA. Sliding flap tracheoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98(12 Pt 1):926-9.
18. Teramachi M, Okumura N, Nakamura T, et al. Intrathoracic tracheal reconstruction with a collagen-conjugated prosthesis: evaluation of the efficacy of omental wrapping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113(4):701-11.
19. Duncavage JA, Ossoff RH, Toohill RJ. Laryngotracheal reconstruction with composite nasal septal cartilage grafts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98(8 Pt 1):581-5.
20. Fandrich F, Schroder DW. Experimental tracheal replacement using a revascularized ileal segment for transplantation in rats. *J Surg Res* 1995;59(5):560-8.
21. de Mello-Filho FV, Mamede RC, Velludo MA. Tracheal neovascularization: a method involving mobilization of a complete tracheal neovascularized segment using a sternohyoid muscle flap. *Laryngoscope* 1996;106(1 Pt 1):81-5.
22. Naficy S, Esclamado RM, Clevens RA. Reconstruction of the rabbit trachea with vascularized auricular perichondrium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105(5):356-62.
23. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 2004;25(9):1545-57.

24. Sakata J, Vacanti CA, Schloo B, Healy GB, Langer R, Vacanti JP. Tracheal composites tissue engineered from chondrocytes, tracheal epithelial cells, and synthetic degradable scaffolding. *Transplant Proc* 1994;26(6):3309-10.
25. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
26. Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered human septal cartilage. *Biomaterials* 2002;23(15):3087-94.
27. Naumann A, Rotter N, Bujia J, Aigner J. Tissue engineering of autologous cartilage transplants for rhinology. *Am J Rhinol* 1998;12(1):59-63.
28. Atala A, Vacanti JP, Peters CA, Mandell J, Retik AB, Freeman MR. Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol* 1992;148(2 Pt 2):658-62.
29. Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127(10):1248-52.
30. Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994;15(6):451-6.
31. Bucheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol* 2003;22(9):549-64.
32. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977;267(5611):531-2.
33. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30(1):215-24.
34. Harrison ET, Jr., Luyten FP, Reddi AH. Osteogenin promotes reexpression of cartilage phenotype by dedifferentiated articular chondrocytes in serum-free medium. *Exp Cell Res* 1991;192(2):340-5.
35. Luyten FP, Chen P, Paralkar V, Reddi AH. Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. *Exp Cell Res* 1994;210(2):224-9.

36. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, et al. Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1991;6(12):1373-85.
37. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 2000;6(4):351-9.
38. Minuth WW, Stockl G, Kloth S, Dermietzel R. Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions. *Eur J Cell Biol* 1992;57(1):132-7.
39. Wald HL, Sarakinos G, Lyman MD, Mikos AG, Vacanti JP, Langer R. Cell seeding in porous transplantation devices. *Biomaterials* 1993;14(4):270-8.
40. Verbruggen G, Veys EM, Wieme N, et al. The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentrations of agarose. *Clin Exp Rheumatol* 1990;8(4):371-8.
41. Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* 1994;15(10):774-8.
42. Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 1994;15(1):55-8.
43. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991;88(5):753-9.
44. Bujia J. [Culturing autologous cartilage tissue for reconstructive surgery: possibilities and limits]. *Laryngorhinootologie* 1995;74(4):205-10.
45. Rotter N, Sittinger M, Hammer C, Bujia J, Kastenbauer E. [Transplantation of in vitro cultured cartilage materials: characterization of matrix synthesis]. *Laryngorhinootologie* 1997;76(4):241-7.
46. Schakenraad JM, Dijkstra PJ. Biocompatibility of poly (DL-lactic acid/glycine) copolymers. *Clin Mater* 1991;7(3):253-69.
47. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-95.

48. Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):351-6.
49. Zacchi V, Soranzo C, Cortivo R, Radice M, Brun P, Abatangelo G. In vitro engineering of human skin-like tissue. *J Biomed Mater Res* 1998;40(2):187-94.
50. Allan B. Closer to nature: new biomaterials and tissue engineering in ophthalmology. *Br J Ophthalmol* 1999;83(11):1235-40.
51. Atala A. Tissue engineering applications for erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1999;11 Suppl 1:S41-7.
52. Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. *Clin Plast Surg* 1999;26(4):629-45, ix.
53. Chaikof EL. Engineering and material considerations in islet cell transplantation. *Annu Rev Biomed Eng* 1999;1:103-27.
54. Chu CF, Lu A, Liszkowski M, Sipehia R. Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472(3):479-85.
55. Jankowski RJ, Wagner WR. Directions in cardiovascular tissue engineering. *Clin Plast Surg* 1999;26(4):605-16, ix.
56. Mayer J, Karamuk E, Akaike T, Wintermantel E. Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system. *J Control Release* 2000;64(1-3):81-90.
57. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):141-50.
58. Lu L, Yaszemski MJ, Mikos AG. Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers. *Biomaterials* 2001;22(24):3345-55.
59. Ito T, Nakamura T, Suzuki K, et al. Regeneration of hypogastric nerve using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with collagen sponge proved electrophysiologically in a canine model. *Int J Artif Organs* 2003;26(3):245-51.
60. Lucke A, Tessmar J, Schnell E, Schmeer G, Gopferich A. Biodegradable poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials* 2000;21(23):2361-70.

61. Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res* 2000;33(2):94-101.
62. Tjia JS, Moghe PV. Analysis of 3-D microstructure of porous poly(lactide-glycolide) matrices using confocal microscopy. *J Biomed Mater Res* 1998;43(3):291-9.
63. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res* 1971;5(3):169-81.
64. Garric X, Moles JP, Garreau H, Braud C, Guilhou JJ, Vert M. Growth of various cell types in the presence of lactic and glycolic acids: the adverse effect of glycolic acid released from PLAGA copolymer on keratinocyte proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13(11):1189-201.
65. Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet MS. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 1999;20(13):1177-85.
66. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 1991;113(2):143-51.
67. Haisch A, Schultz O, Perka C, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M. [Tissue engineering of human cartilage tissue for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin gel and polymer carriers]. *HNO* 1996;44(11):624-9.
68. Minuth WW, Sittinger M, Kloth S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res* 1998;291(1):1-11.
69. Duda GN, Haisch A, Endres M, et al. Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo. *J Biomed Mater Res* 2000;53(6):673-7.
70. Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 1997;34(2):211-20.
71. Athanasiou KA, Agrawal CM, Barber FA, Burkhart SS. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy* 1998;14(7):726-37.
72. Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000;21(5):431-40.

73. Bujia J, Reitzel, Sittinger M. [In vitro cultivation of cartilage tissue for reconstructive surgery: effect of L(+)-lactate and glycolate on cultivated human chondrocytes]. *Laryngorhinootologie* 1995;74(3):183-7.
74. Rotter N, Aigner J, Naumann A, et al. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998;42(3):347-56.
75. Yang J, Shi G, Bei J, et al. Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res* 2002;62(3):438-46.
76. Haisch A, Groger A, Radke C, et al. Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation. *Biomaterials* 2000;21(15):1561-6.
77. Haisch A, Groger A, Radke C, et al. [Protection of autogenous cartilage transplants from resorption using membrane encapsulation]. *Hno* 2000;48(2):119-24.
78. Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9(5):475-87.
79. Haisch A, Wanjura F, Radke C, et al. Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261(4):216-24.
80. Gao J, Niklason L, Langer R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res* 1998;42(3):417-24.
81. Park A, Wu B, Griffith LG. Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9(2):89-110.
82. Collier JH, Camp JP, Hudson TW, Schmidt CE. Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res* 2000;50(4):574-84.

83. Friess W. Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45(2):113-36.
84. Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D. Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 1998;40(1):48-56.
85. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release* 1998;53(1-3):93-103.
86. Vercruyse KP, Prestwich GD. Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15(5):513-55.
87. Williams D. Collagen: ubiquitous in nature, multifunctional in devices. *Med Device Technol* 1998;9(6):10-3.
88. de Chalain T, Phillips JH, Hinek A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin. *J Biomed Mater Res* 1999;44(3):280-8.
89. Kang HW, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20(14):1339-44.
90. Khang G, Lee SJ, Lee JH, Kim YS, Lee HB. Interaction of fibroblast cells on poly(lactide-co-glycolide) surface with wettability chemogradient. *Biomed Mater Eng* 1999;9(3):179-87.
91. Metters AT, Anseth KS, Bowman CN. Fundamental studies of biodegradable hydrogels as cartilage replacement materials. *Biomed Sci Instrum* 1999;35:33-8.
92. Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res* 2000;50(2):101-9.
93. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001;221(1-2):1-22.
94. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24(24):4353-64.

95. Kawamura M, Urist MR. Induction of callus formation by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop Relat Res* 1988(236):240-8.
96. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28(1):5-24.
97. Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang* 1997;72(3):133-43.
98. Heystek J, Maier-van der Zande GM, Brummelhuis HG, Krijnen HW. Contributions to the optimal use of human blood. VI. Modification of the method to prepare prothrombin complex on a large scale. *Vox Sang* 1975;29(3):177-83.
99. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Hammer C, Sittinger M. Behavior of tissue-engineered human cartilage after transplantation into nude mice. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10(10/11):689-93.
100. Bujia J, Alsalameh S, Naumann A, Wilmes E, Sittinger M, Burmester GR. Humoral immune response against minor collagens type IX and XI in patients with cartilage graft resorption after reconstructive surgery. *Ann Rheum Dis* 1994;53(4):229-34.
101. Naumann A, Bujia J, Hammer C, Wilmes E. [Autoantibodies against cartilage components: clinical relevance for reconstructive surgery in the area of the head and neck]. *Laryngorhinootologie* 1994;73(5):253-7.
102. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980;210(4472):908-10.
103. Dautzenberg H, Holzapfel G, Lukanoff B. Methods for a comprehensive characterization of microcapsules based on polyelectrolyte complexes. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1993;21(3):399-405.
104. Sittinger M, Lukanoff B, Burmester GR, Dautzenberg H. Encapsulation of artificial tissues in polyelectrolyte complexes: preliminary studies. *Biomaterials* 1996;17(10):1049-51.
105. Mak AF, Lai WM, Mow VC. Biphasic indentation of articular cartilage--I. Theoretical analysis. *J Biomech* 1987;20(7):703-14.

106. Mow VC, Ratcliffe A, Rosenwasser MP, Buckwalter JA. Experimental studies on repair of large osteochondral defects at a high weight bearing area of the knee joint: a tissue engineering study. *J Biomech Eng* 1991;113(2):198-207.
107. Mayr E, Frankel V, Ruter A. Ultrasound--an alternative healing method for nonunions? *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120(1-2):1-8.
108. Mayr E, Laule A, Suger G, Ruter A, Claes L. Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound. *J Orthop Trauma* 2001;15(6):407-14.
109. Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, et al. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma* 1990;4(3):246-53.
110. Tanzer M, Harvey E, Kay A, Morton P, Bobynd JD. Effect of noninvasive low intensity ultrasound on bone growth into porous-coated implants. *J Orthop Res* 1996;14(6):901-6.
111. Bujia J, Pitzke P, Kastenbauer E, Wilmes E, Hammer C. Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal chondrocytes cultured in monolayer and in agar. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;253(6):336-40.
112. Bujia J, Sittlinger M, Minuth WW, Hammer C, Burmester G, Kastenbauer E. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. *Acta Otolaryngol* 1995;115(2):307-10.
113. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res* 1988;18(3):223-34.
114. Staindl O GO. Zur Resorption des Fibrinklebers nach plastischen Operationen im Gesichtsbereich. Eine Untersuchung mit radioaktiven Isotopen. In: Cotta H BA, ed. *Fibrinkleber in der Orthopädie und Traumatologie*. Stuttgart: Thieme; 1982.
115. Kaeser A DN. Grundlagen der Fibrinklebung: Qualitätsanforderungen und Infektionssicherheit von Fibrinkleber. In: Haverich A HC, ed. *Fibrinklebung in der Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie*. Darmstadt: Steinkopff; 1993:13-23.
116. Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 1993;64(4):441-5.

117. Kjaergard HK, Weis-Fogh US. Autologous fibrin glue for sealing vascular prostheses of high porosity. *Cardiovasc Surg* 1994;2(1):45-7.
118. Shakibaei M, De Souza P. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* 1997;21(2):75-86.
119. Shakibaei M. Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol Histopathol* 1995;10(2):339-49.
120. Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 2004;10(1-2):109-18.
121. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* 1999;64(2):67-76.
122. Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V, Svoboda KK. Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dyn* 1997;210(3):249-63.
123. Yang SY, Ahn ST, Rhie JW, et al. Platelet supernatant promotes proliferation of auricular chondrocytes and formation of chondrocyte mass. *Ann Plast Surg* 2000;44(4):405-11.
124. Cao L, Lee V, Adams ME, et al. beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol* 1999;18(4):343-55.
125. Pulai JI, Del Carlo M, Jr., Loeser RF. The alpha5beta1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1528-35.
126. Billingham RC, Wu W, Ionescu M, et al. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum* 2000;43(3):664-72.
127. Berguer R, Staerkel RL, Moore EE, Moore FA, Galloway WB, Mockus MB. Warning: fatal reaction to the use of fibrin glue in deep hepatic wounds. Case reports. *J Trauma* 1991;31(3):408-11.
128. Muntean W, Zenz W, Edlinger G, Beitzke A. Severe bleeding due to factor V inhibitor after repeated operations using fibrin sealant containing bovine thrombin. *Thromb Haemost* 1997;77(6):1223.

129. Radosevich M GH, Burnouf T. Fibrinsealant: scientific rationale, production methods, properties and current clinical use. *Voxsang* 1997;72(3):133-43.
130. Tanaka K MK, Nishimaki H, Iga Y, inventor Process for treating thrombin. US. 1990 May 8.
131. Seelich T RH. Theoretische Grundlagen des Fibrinklebers. In: K S, ed. Neues über Fibrinogen und Fibrinkleber. Stuttgart-New-York: Schattauer; 1981:199-208.
132. Fortier LA, Brofman PJ, Nixon AJ, Mohammed HO. Disparate chondrocyte metabolism in three-dimensional fibrin cultures derived from autogenous or commercially manufactured fibrinogen. *Am J Vet Res* 1998;59(4):514-20.
133. Somers T, De Cubber J, Govaerts P, Offeciers FE. Total auricular repair: bone anchored prosthesis or plastic reconstruction? *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1998;52(4):317-27.
134. Nagata S. Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part IV. Ear elevation for the constructed auricle. *Plast Reconstr Surg* 1994;93(2):254-66; discussion 67-8.
135. Brent B. Auricular repair with autogenous rib cartilage grafts: two decades of experience with 600 cases. *Plast Reconstr Surg* 1992;90(3):355-74; discussion 75-6.
136. Weerda H. [Our experience with the surgery of the auricle II. Surgery of the macrotia and the cup ear (author's transl)]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1982;61(7):350-3.
137. Weerda H. [Personal experiences in the surgery of external ear abnormalities. IV. Microtia]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1982;61(9):497-500.
138. Weerda H. [Personal experiences in the surgery of external ear abnormalities. III. The "miniear" and the severely deformed "cup ear"]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1982;61(9):493-6.
139. Weerda H. [Surgery of juvenile external ear abnormalities]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1984;63(3):120-2.
140. Weerda H. Surgical reconstruction of the auricle. *Adv Otorhinolaryngol* 1987;37:156-7.
141. Romo T, 3rd, Fozo MS, Sclafani AP. Microtia reconstruction using a porous polyethylene framework. *Facial Plast Surg* 2000;16(1):15-22.

142. Saim AB, Cao Y, Weng Y, et al. Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold. *Laryngoscope* 2000;110(10 Pt 1):1694-7.
143. Logan TC, Henrich DE, Shockley WW. Effect of stenting on graft vascularization after laryngotracheoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105(8):585-91.
144. Scuderi N, Rubino C. The use of an island chondromucosal flap in eyelid reconstruction: preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 1993;92(7):1409-10.
145. Slater PW, Rizer FM, Schuring AG, Lippy WH. Practical use of total and partial ossicular replacement prostheses in ossiculoplasty. *Laryngoscope* 1997;107(9):1193-8.
146. Carmen Bano M, Cohen S, Visscher KB, Allcock HR, Langer R. A novel synthetic method for hybridoma cell encapsulation. *Biotechnology (N Y)* 1991;9(5):468-71.
147. Riker AT SS, Hablan PA, Eisenbarth GS, Bonner-Weir S. Hyperimmun response to microencapsulated xenogenic tissue in non-obese diabetic mice. In: MA J, ed. *The immunology of diabetes mellitus*. Amsterdam: Elsevier Science; 1996:193.
148. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997;100(2):297-302; discussion 3-4.
149. Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124(6):671-7.
150. De Vos P, De Haan BJ, Van Schilfgaarde R. Factors causing failure of islets in nonovergrown capsules. *Transplant Proc* 1998;30(2):496-7.
151. Weber C, Tanna A, Costanzo M, Ayres-Price J, Peterson L, Wicker L. Effects of host genetic background and microencapsulation on survival of rat-to-mouse islet xenografts. *Transplant Proc* 1994;26(3):1186-8.
152. Villinger. *Cytokines und Rheumatic diseases*. Bern, Göttingen, Toronto, Seattle: Huber; 1998.
153. Fann PC, Hartman DF, Goode RL. Pharmacologic and surgical enhancement of composite graft survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119(3):313-9.

154. Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1997;40(11):2055-64.
155. Ho ML, Chang JK, Wang GJ. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1995(313):270-8.
156. Moell C, Aronson AS, Selvik G. Growth in rabbits during alternate-day cortisone injections: near normal growth on days without cortisone. *Acta Paediatr Scand* 1988;77(5):693-8.
157. Tam CS, Cruickshank B, Swinson DR, Anderson W, Little HA. The response of bone apposition rate to some nonphysiologic conditions. *Metabolism* 1979;28(7):751-5.
158. Brantus JF, Meunier PJ. Effects of intravenous etidronate and oral corticosteroids in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop Relat Res* 1998(346):117-20.
159. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64(2):295-312.
160. Mow VC, Gibbs MC, Lai WM, Zhu WB, Athanasiou KA. Biphase indentation of articular cartilage--II. A numerical algorithm and an experimental study. *J Biomech* 1989;22(8-9):853-61.
161. Hayes WC, Keer LM, Herrmann G, Mockros LF. A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage. *J Biomech* 1972;5(5):541-51.
162. Zhang M, Zheng YP, Mak AF. Estimating the effective Young's modulus of soft tissues from indentation tests--nonlinear finite element analysis of effects of friction and large deformation. *Med Eng Phys* 1997;19(6):512-7.
163. Rotter N, Tobias G, Lebl M, et al. Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage. *Arch Biochem Biophys* 2002;403(1):132-40.
164. Ma PX, Schloo B, Mooney D, Langer R. Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage. *J Biomed Mater Res* 1995;29(12):1587-95.
165. Barnett SB, Rott HD, ter Haar GR, Ziskin MC, Maeda K. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997;23(6):805-12.
166. ter Haar G. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound* 1999;9(1):3-9.

167. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 1996;14(5):802-9.
168. Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EY, Ilstrup DM, Greenleaf JF. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 1994;12(1):40-7.
169. Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 2002;59(2):201-6.
170. Parvizi J, Wu CC, Lewallen DG, Greenleaf JF, Bolander ME. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J Orthop Res* 1999;17(4):488-94.
171. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57(4):409-19; discussion 20.
172. Cohen S, Bano MC, Cima LG, et al. Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering. *Clin Mater* 1993;13(1-4):3-10.
173. Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR. Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 1999;58(3):130-5.
174. Vacanti CA VJ. Functional organ replacement: The new technology of tissue engineering. London: Century Press; 1991.
175. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006;10(3):569-76.

## 9. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Kindern Louisa und Victor und insbesondere meiner Frau Natascha sowie meinen Eltern, die mir jederzeit während meiner klinischen und wissenschaftlichen Arbeit mit Ausgleich und Verständnis für den persönlichen Einsatz begegnet sind.

Herrn Professor Dr. H. Scherer, Direktor der HNO Klinik der Charité, danke ich für die Aufnahme in seine Klinik und die stets großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeit, sowie für zahlreiche Anregungen und für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen.

Herrn Professor Dr. V. Jahnke, Direktor emer. der HNO Klinik der Charite, danke ich für die Wegbereitung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeit in den ersten Jahren meiner universitären Tätigkeit.

Herzlichen und besonderen Dank gebühren Herrn Priv. Doz. Dr. M. Sittinger und Herrn Professor Dr. R. Burmester die mir durch ihre fördernde, bedingungslose Haltung den Zugang zur wissenschaftlichen Arbeit und insbesondere zum Tissue engineering ermöglicht haben.

Ebenso geht mein großer Dank an zahlreiche Kollegen in Klinik und Wissenschaft, die meinen Weg unterstützend begleitet haben. Stellvertretend seien hier die Herren Professor Dr. H. Enzmann und Priv. Doz. Dr. B. Sedlmaier für ihre stets freundschaftliche und kollegiale Mitwirkung genannt.

Bedanken möchte ich mich im Besonderen bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung der wissenschaftlichen Untersuchungen.

Den Arbeitsgruppenmitgliedern Frau Dipl. Biotech. Ing. U. Marzahn, J. Bartel und Frau Dr. A. Evers, deren Anstellungsverhältnis durch Drittmittel der DFG finanziert wurden, danke ich herzlich für die stets kollegiale und von hohem Einsatz geprägte Tätigkeit.

Herrn Prof. Dr. H. Lobeck und Frau Dr. C. Radtke ehemals Institut für Pathologie am CVK und Frau Dr. K. Jöhrens-Leder, Institut für Pathologie am CBF danke ich für die sehr motivierte Unterstützung bei der Durchführung und Interpretation der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. N Duda stellvertretend für die Mitarbeiter des Muskuloskeletalen Zentrums danke ich für die zielorientierte Zusammenarbeit im Rahmen der biomechanischen Untersuchungen.

Herrn Professor C. Siestrup, Herrn Dr. S. Nagel und Herrn Dr. M. Meißler, Tierexperimentelle Einrichtung des CVK und Frau Dr. R. Thiel, Tierexperimentelle Einrichtung des CBF danke ich für die ausdauernde Unterstützung bei der Durchführung tierexperimenteller Untersuchungen.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Sudhoff und Herrn Dr. J. Ebmeyer, HNO Klinik der Ruhr-Universität Bochum, gilt man besonderer Dank für die elektronen- mikroskopische Darstellung der Transplantatmorphologie.

Herrn Prof. Dr. M. Shakibaei, Muskuloskeletale Forschungsgruppe der LMU München danke ich für seine vielen Ratschläge und die großzügige Unterstützung im Rahmen der Untersuchungen zur Knorpelmorphologie. Frau Dr. G. Schulze-Tanzil, Klinik für Unfallchirurgie, CBF bin ich sehr dankbar für die fachkompetente Hilfe bei der Etablierung von Untersuchungstechniken.

Frau Priv. Doz. Dr. N. Rotter, Univ.-HNO-Klinik Lübeck sowie Herrn Dr. M. Bücheler und Herrn Prof. F. Bootz, Univ.- HNO Klinik Bonn und Herrn Professor A. Berghaus, Univ.-HNO-Klinik der LMU München gilt mein besonderer Dank für die stets freundschaftlich verbundene Zusammenarbeit und die permanente Vertretung des jungen Arbeitsgebietes `Tissue Engineering´ in der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie.

Herrn C. Gebert, Kinderchirurgie CVK und Herrn Dr. A. Gröger, Plastische Chirurgie, Harvard Boston, Herrn Dr. A. Loch, HNO-Klinik CCM, Herrn Dr. F. Wanjura, Kinderchirurgie Univ.-Klinik Rostock, alle vormals AG Tissue Engineering der HNO-Klinik danke ich für die ausnahmslos gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

## 10. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift