

Aus der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,  
Campus Benjamin Franklin  
und dem Labor für Tissue Engineering,  
Charité, Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das  
Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

**Vergleichende Untersuchungen  
am immun- und nichtimmunmodulierten Schwein  
nach subkutaner Implantation in vitro präformierter  
Knorpelgewebe**

- Eine experimentelle Studie -

**INAUGURAL - DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

**DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE**

durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Anja Becker, geb. Evers**

Tierärztin aus Hildesheim

Berlin 2005

Journal-Nr. 2890

gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M.F.G. Schmidt
Zweiter Gutachter:	PD Dr. rer. nat. M. Sittinger
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. G. Pauli

Deskriptoren nach dem CAB-Thesaurus:

Tissue Engineering (MeSH), cartilage, swine, cell culture, cell differentiation,  
transplantation

Tag der Promotion: 08.07.2005

**MEINEN ELTERN**

**UND GESCHWISTERN**



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2. SCHRIFTTUM</b> .....	<b>1</b>
<b>2.1 Tissue Engineering</b> .....	<b>1</b>
2.1.1 Definition .....	1
2.1.2 Prinzip .....	2
2.1.3 De – und Redifferenzierung der Chondrozyten <i>in vitro</i> .....	3
2.1.4 Trägermaterialien .....	4
2.1.4.1 Ethisorb® .....	5
2.1.4.2 Kieselgelfaser .....	6
2.1.4.3 Fibrinkleber .....	8
2.1.4.4 Weitere Trägermaterialien.....	8
2.1.5 Historie der Transplantationschirurgie und der Zellkulturtechnik.....	9
<b>2.2 Der Knorpel</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 Zusammensetzung des Knorpelgewebes .....	11
2.2.1.1 Das Perichondrium .....	12
2.2.1.2 Der hyaline Knorpel .....	13
2.2.1.3 Der elastische Knorpel .....	13
2.2.1.4 Der Faserknorpel .....	14
2.2.2 Ernährung und Regeneration.....	14
<b>2.3 Die Transplantation</b> .....	<b>15</b>
2.3.1 Transplantationsarten .....	15
2.3.1.1 Autologe Transplantation .....	15
2.3.1.2 Allogene/Homologe Transplantation .....	16
2.3.1.3 Syngene Transplantation .....	16
2.3.1.4 Xenogene Transplantation.....	16
2.3.2 Implantationslokalisationen .....	16
2.3.2.1 Heterotrope Transplantation.....	16
2.3.2.2 Isotrope und orthotrope Transplantation .....	17
<b>2.4 Pathologie im Transplantationsgeschehen</b> .....	<b>17</b>
2.4.1 Entzündungsreaktion .....	17
2.4.1.1 Definition und Ursachen .....	17
2.4.1.2 Morphologische Grundvorgänge und klinische Erscheinungen .....	17
2.4.1.3 Einflüsse auf den Ablauf der entzündlichen Reaktion .....	19
2.4.1.4 Fremdkörperreaktion .....	20
2.4.1.5 Zeitlicher Verlauf der Entzündung.....	20
2.4.1.6 Heilung der akuten Entzündung .....	21
2.4.1.7 Heilung der chronisch proliferativen Entzündung .....	21
2.4.1.8 Besonderheiten der kutanen Wundheilung .....	21
2.4.2 Transplantatabstoßung .....	22
2.4.2.1 Transplantatabstoßung vom hyperakuten Typ .....	22
2.4.2.2 Transplantatabstoßung vom akuten Typ .....	22
2.4.2.3 Transplantatabstoßung vom chronischen Typ.....	23
2.4.3 Immunmodulatoren .....	23

2.4.3.1	Glukokortikoide .....	23
2.4.3.2	Zytotoxische Medikamente .....	25
2.4.3.3	Cyclosporin A .....	25
2.4.3.4	Poly- und monoklonale Antikörper .....	26
<b>3.</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>27</b>
4.1.1	Tiere .....	27
4.1.2	Material für die Operationen am Tier und die Immunmodulation .....	28
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur und den Transplantatbau .....	29
4.1.4	Geräte und Zubehör .....	30
4.1.5	Material für die histologischen Färbungen .....	32
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>33</b>
4.2.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen .....	33
4.2.1.1	Chondrozytengewinnung .....	33
4.2.1.1.1	Ablatio auris .....	33
4.2.1.1.2	Präparation und Zerkleinerung des Knorpels .....	33
4.2.1.1.3	Knorpelverdau, Isolierung der Chondrozyten, Zellvermehrung .....	34
4.2.1.1.4	Passagieren der Zellen, Zellernte .....	36
4.2.1.2	Fibrinkleber .....	36
4.2.1.3	Transplantatbau .....	37
4.2.1.3.1	Verwendetes Trägermaterial .....	38
4.2.1.4	Vorkultivierung .....	40
4.2.1.5	Sterilkontrollen .....	41
4.2.1.6	Implantation der Transplantate .....	42
4.2.1.7	Heterotrope Transplantation .....	43
4.2.1.8	Immunmodulation zur Transplantatprotektion .....	44
4.2.1.9	Explantationen .....	45
4.2.1.9.1	Explantationszeitpunkte .....	45
4.2.1.10	Blutentnahme .....	45
4.2.1.11	Histologie .....	46
4.2.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen .....	47
4.2.2.1	Auswirkungen von Fetalem Kälberserum beziehungsweise von Schweineserum auf die Chondrozyten <i>in vitro</i> .....	47
4.2.2.2	Entwicklung <i>in vitro</i> kultivierter Transplantate (mit/ohne Kieselgelfasern) .....	48
	besiedelt mit Chondrozyten aus verschiedenen Passagen (Methode .....	48
	Versuchstiergruppe 2) .....	48
4.2.2.3	<i>In vitro</i> Kultivierung verschiedener Transplantate .....	49
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b><i>In vivo</i> Untersuchungen .....</b>	<b>50</b>
5.1.1	Isolierte Chondrozyten .....	50
5.1.2	Fibrinogen .....	50
5.1.3	Sterilkontrollen .....	51
5.1.4	Explantationen .....	51
5.1.4.1	Makroskopie .....	51

---

5.1.4.2 Histologie .....	60
5.1.5 Blutentnahmen .....	79
5.1.5.1 Gesamtleukozytenzahl, Differentialblutbilder .....	79
5.1.5.2 Glukosebestimmung, Serumelektrolytwerte .....	81
<b>5.2 <i>In vitro</i> Untersuchungen .....</b>	<b>82</b>
5.2.1 Auswirkungen von Fetalem Kälberserum beziehungsweise von Schweineserum auf die Chondrozyten <i>in vitro</i> .....	82
5.2.2 Entwicklung <i>in vitro</i> kultivierter Transplantate (mit/ohne Kieselgelfasern) mit .....	84
Chondrozyten aus verschiedenen Passagen (Methode Versuchstiergruppe 2) .....	84
5.2.3 <i>In vitro</i> Kultivierung verschiedener Transplantate.....	89
<b>5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>91</b>
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>95</b>
<b>6.1 Tissue Engineering und das Immunsystem .....</b>	<b>95</b>
<b>6.2 Die Trägermaterialien.....</b>	<b>98</b>
6.2.1 Polylaktid-Polyglykolid-Copolymere .....	98
6.2.2 Fibrinkleber .....	99
6.2.3 Alginat - ein alternatives Trägermaterial?.....	101
<b>6.3 Die De- und Redifferenzierung der Chondrozyten .....</b>	<b>102</b>
<b>6.4 Die Immunmodulation und ihre Auswirkungen .....</b>	<b>103</b>
<b>6.5 Ein Ausblick.....</b>	<b>105</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>110</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>111</b>
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	111
9.2 Schrifttumsverzeichnis.....	112
9.3 Publikationen .....	127
9.4 Tabellen .....	128
9.5 Abbildungsverzeichnis .....	137
9.6 Tabellenverzeichnis .....	139
9.7 Danksagung.....	142
9.8 Erklärung.....	143
9.9 Lebenslauf.....	144