

**Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. Ertel**

# **Biokompatibilität von in vitro gezüchteten osteochondralen Biphasen in der Nacktmaus**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

**vorgelegt von:** Stefan Tietze

**aus:** Dresden

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Christian Müller-Mai

**Korreferent:** Prof. Dr. Norbert P. Haas

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus  
Benjamin Franklin

**Promoviert am:** 25.02.2005

**Widmung**

Gewidmet denen, die mich geliebt, geformt und gefördert haben. Das gilt insbesondere meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$ -TCP	$\alpha$ -Tricalciumphosphat
Abb.	Abbildung
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
BSA	bovines Serum Albumin
CD	Zelloberflächenantigen (cluster determinants)
CPC	Calciumphosphatzement
CSPG	Chondroitin Sulfate Proteoglykan
d	Tage
DCPD	Dicalciumphosphatdihydrat
DCPDC	Dicalciumphosphatdihydratzement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
ff.	folgende
HA	Hydroxylapatit
HEPES	Hydroxyäthylpiperazinäthansulfonsäure
IE	Internationale Einheit(en)
IGF	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (insuline-like growth factors)
KIE	Kallikrein-Inhibitor-Einheit
MCPM	Monocalciumphosphatmonohydrat
mRNA	Messenger-RNA (ribonucleic acid)
OCT	osteochondrale Zylindertransplantation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PDS	Polydioxanon
PGA	Polyglycolsäure (polyglycol acid)
PGLA	Poly-Milch-Glykolsäure (poly-lactic-co-glycolic acid)

PLA	Polymilchsäure (polylactic acid)
PLLA	Poly-L-Milchsäure (poly-L-lactic acid)
PMMA	Polymethylmetacrylat
RPMI-1640	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
Tris	Tris-Puffer, Trometamol, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TTCP	Tetracalciumphosphat

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Hyaliner Knorpel</b>	<b>9</b>
1.1.1	Allgemeines	9
1.1.2	Extrazelluläre Matrix	9
1.1.3	Differenzierung und Dedifferenzierung von Knorpelgewebe	11
1.1.4	Heilung und Regeneration von Knorpel	12
<b>1.2</b>	<b>Knochenzemente</b>	<b>13</b>
1.2.1	Historische Entwicklung	13
1.2.2	Anforderungen an resorbierbare Knochenzemente	14
1.2.3	Calciumphosphatzemente	14
<b>1.3</b>	<b>Tissue Engineering</b>	<b>15</b>
1.3.1	Definition	15
1.3.2	Zell- und Gewebekultur	16
1.3.3	Biomaterialien für das Tissue Engineering	16
1.3.4	Tissue Engineering chondraler Gewebe	17
<b>1.4</b>	<b>Die osteochondrale Biphase</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Aufgabenstellung und Ziele</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>20</b>
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Reagenzien und Lösungen	21
2.1.3	Medien	22
2.1.4	Zusammensetzung des Fibrinklebers	22
2.1.5	Enzymmix	23
2.1.6	Materialien zur Implantatherstellung	23
<b>2.2</b>	<b>Chondrozytengewinnung und Zellkultur</b>	<b>23</b>
2.2.1	Gewinnung der bovinen Chondrozyten	23
2.2.2	Zellzählung im Hämozytometer	24
2.2.3	Zellkultur	25
<b>2.3</b>	<b>Herstellung der Implantate</b>	<b>26</b>
2.3.1	Die leeren Implantate	26
2.3.2	Beladen der Implantate mit Chondrozyten	27
2.3.2.1	Implantate mit Polymervlies	27
2.3.2.2	Implantate ohne Polymervlies	27
2.3.3	Vorkultivierung der Implantate	28

<b>2.4</b>	<b>Tierexperimente</b>	<b>28</b>
2.4.1	Versuchstiere und Tierhaltung	28
2.4.2	Betäubung der Versuchstiere	29
2.4.3	Operationsverfahren	29
2.4.3.1	Implantation	29
2.4.3.2	Explantation	30
<b>2.5</b>	<b>Präparation</b>	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Auswertung</b>	<b>31</b>
2.6.1	Qualitative Auswertung	31
2.6.2	Histologischer Score	31
2.6.3	Histomorphometrie	32
2.6.3.1	Messungen	32
2.6.3.2	Auswertung	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Osteochondrale Biphasen ohne PGLA-Vlies</b>	<b>34</b>
3.1.1	7 Tage Liegezeit	34
3.1.1.1	Makroskopie	34
3.1.1.2	Lichtmikroskopie	34
3.1.2	14 Tage Liegezeit	36
3.1.2.1	Makroskopie	36
3.1.2.2	Lichtmikroskopie	36
3.1.3	28 Tage Liegezeit	37
3.1.3.1	Makroskopie	37
3.1.3.2	Lichtmikroskopie	38
3.1.4	84 Tage Liegezeit	39
3.1.4.1	Makroskopie	39
3.1.4.2	Lichtmikroskopie	39
<b>3.2</b>	<b>Osteochondrale Biphasen mit PGLA-Vlies</b>	<b>40</b>
3.2.1	7 Tage Liegezeit	40
3.2.1.1	Makroskopie	40
3.2.1.2	Lichtmikroskopie	41
3.2.2	14 Tage Liegezeit	42
3.2.2.1	Makroskopie	42
3.2.2.2	Lichtmikroskopie	42
3.2.3	28 Tage Liegezeit	43
3.2.3.1	Makroskopie	43
3.2.3.2	Lichtmikroskopie	44
3.2.4	84 Tage Liegezeit	45
3.2.4.1	Makroskopie	45
3.2.4.2	Lichtmikroskopie	45

<b>3.3</b>	<b>Histologischer Score</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Histomorphometrie</b>	<b>49</b>
3.4.1	Knorpelhöhen	49
3.4.2	Regelmäßigkeit der Knorpeloberfläche	50
3.4.3	Knorpelfläche	51
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1	Knorpelgewinnung, Zellkultur und Implantation	52
4.2	Das bioresorbierbare Polymervlies als Trägerstruktur	53
4.3	Der verwendete Knochenzement	56
4.4	Ausblick	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>64</b>
6.1	Abbildungen	64
6.2	Tabellen zur Histomorphometrie	80
6.2.1	Messdaten der Knorpeldicken	80
6.2.2	Messdaten der Knorpelflächen	81
6.2.3	statistische Ergebnistabelle der Knorpelhöhen und deren Varianz	81
6.2.4	statistische Ergebnistabelle der Knorpelflächen	82
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>



## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir zur Seite gestanden und durch ihre Hilfe einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben, insbesondere bei Herrn PD Dr. Christian Müller Mai für die Überlassung des Themas und den immer nützlichen Hinweisen für einen schnellen und sachgerechten Abschluss der vorliegenden Promotion. Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Ulrich Gross für die persönlichen Diskussionen, in denen er mir jederzeit mit Rat zur Seite stand.

Ganz großen Dank auch an die Arbeitsgemeinschaft von Herrn PD Dr. Michael Sittinger, für die großzügige Bereitstellung der Labore und Materialien des Tissue Engineering und der Organisation, Herrn Dr. Christian Kaps für die hilfreichen Hinweise und neuen Ideen. Frau Johanna Golla für ihre freundlichen Anregungen und ihre Hilfe und Frau Michaela Endres und Frau Heike Smolian, sowie allen weiteren Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit.

Großen Dank möchte ich auch an Herrn Markus B. Mensing richten, für seine Mithilfe bei der Operation der Tiere sowie Betreuung und Einführung in die Thematik. Nicht vergessen möchte ich die Mitarbeiterinnen des Labors für Biomaterialforschung in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Campus Benjamin Franklin, vor allem Frau Dilger-Rein, für Ihre Hilfe bei der Erstellung und Aufarbeitung der Präparate und Hilfestellungen im Labor.

Herrn Krosch möchte ich für die Geduld und Unterstützung bei der lichtmikroskopischen Auswertung danken und Herrn Pascal Dehl für das unermüdliche gemeinsame Durchhaltevermögen.

## 9 Lebenslauf

geboren am 27.12.1978 in Dresden

- 1985-1989: Einschulung in 46. POS Dresden
- 1989-1991: 106. POS Dresden, Albert Hensel
- 1991-1992: Pestalozzischule Dresden (Erweiterte Oberschule)
- 1992-1997: Pestalozzi-Gymnasium Dresden mit mathematisch naturwissenschaftlichem Profil
- 1997-2004: Studium der Humanmedizin, Freie Universität Berlin
- 2001-2002 Famulaturen in der MKG-Chirurgie der Uni-Klinik Dresden, der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Campus Benjamin Franklin Berlin, einer internistischen Praxis in Berlin und dem Roten Kreuz Valencia/Venezuela
- 2003-2004 PJ in der Klinik für Innere Medizin im Unfallkrankenhaus Berlin bei Prof. Kleber, Klinik für Orthopädie im Immanuel-Krankenhaus bei Prof. Sparmann und Chirurgie in der Traumatologie, Herz- und Gefäß-, sowie Viszeralchirurgie der Universität de Barcelona u.a. bei Prof. Vergara