

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Biokompatibilität von osteochondralen
Biphasen im femoropatellaren Gleitlager
des Kaninchen gelenks**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von

Pascal Dehl

aus Berlin

Gutachter:

- 1. Priv. –Doz. Dr. med. C. Müller- Mai**
- 2. Prof. Dr. med. U. Weber**
- 3. Prof. Dr. M. Shakibaei**

Datum der Promotion: 23.06.2006

Widmung

Ich widme diese Arbeit all denen, welche mich mit ihrem Vertrauen und ihrer Liebe in meinem Tun unterstützt haben. Das gilt insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abkürzungsverzeichnis

α -TCP	α -Tricalciumphosphat
Abb.	Abbildung
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
bFGF	basic Fibroblasten Wachstumsfaktor
BSA	Rinder Serum Albumin
CD	Zelloberflächenantigen
CPC	Calciumphosphatzement
DCPD	Dicalciumphosphatdihydrat
DCPDC	Dicalciumphosphatdihydratzement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälber Serum
HA	Hydroxylapatit
HRP	Meerrettichperoxidase
I.E.	Internationale Einheit
IGF	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor
KIE	Kallikrein Inhibitor Einheit
MCPM	Monocalciumphosphatmonohydrat
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
OCT	Osteochondrale Zylindertransplantation
P/S	Penicillin/Streptomycin

PBS	Phosphat gepuffertes Saline
PGA	Poly-Glycol Säure(Polyglycolsäure)
PGLA	Poly-Lactid-co-Glykolid Säure
PLLA	Poly-L-LactidSäure (Poly-L-Milchsäure)
PMMA	Polymethylmetacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
<u>RPMI-1640</u>	Zellkulturmedium
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	Transforming Wachstumsfaktor
Tris	Tris-Puffer, Trometamol, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TTCP	Tetracalciumphosphat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Hyaliner Knorpel	10
1.1.1	Allgemeines	10
1.1.2	Extrazelluläre Matrix	10
1.1.3	Differenzierung und Dedifferenzierung von Knorpelgewebe	12
1.1.4	Heilung und Regeneration von Knorpel	13
1.2	Knochenzemente	14
1.2.1	Anforderungen an resorbierbare Knochenzemente	15
1.2.2	Calciumphosphatzemente	16
1.3	Tissue Engineering	17
1.3.1	Definition	17
1.3.2	Zellkulturtechnik	18
1.3.3	Tissue Engineering chondraler Gewebe	19
1.4	Die osteochondrale Biphase	21
1.5	Aufgabenstellung und Ziele	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Die Zementphase	23
2.1.2	Die Knorpelphase	23
2.1.3	Geräte	25
2.1.4	Reagenzien und Lösungen	26
2.1.5	Rohmedien	28
2.1.6	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	28
2.1.7	Zusammensetzung des Fibrinklebers	29
2.1.8	Enzymmix	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Gewinnung von Knorpelzellen	30
2.2.1.1	Knorpelentnahme	30

Isolierung primärer Chondrozyten aus Knorpelgewebe	30
2.2.1.3 Zellzählung im Hämocytometer	31
2.2.2 Zellkultur	32
2.2.3 Herstellung der Implantate	33
2.2.3.1 Die zellfreien Implantate	33
2.2.3.2 Beladen der Implantate mit Chondrozyten	36
2.2.4 Vorkultivierung der fertigen Implantate	36
2.3 Tierexperimente	38
2.3.1 Versuchstiere und Tierhaltung	38
2.3.2 Operationsverfahren	38
2.3.2.1 Implantation	38
2.3.2.2 Explantation	39
2.4 Präparation	40
2.4.1 Immunhistologie und In-situ-Hybridisierung	40
2.4.2 Lichtmikroskopie	40
2.4.3 Elektronenmikroskopie	41
2.5 Auswertung	42
2.5.1 Qualitative Auswertung	42
2.5.2 Quantitative Auswertung	42
2.5.2.1 Messungen	42
2.5.2.2 Auswertung	42
3 Ergebnisse	44
3.1 Vor der Implantation	44
3.2 7 Tage Liegezeit	44
3.2.1 Nach der Explantation	44
3.2.2 Lichtmikroskopie	45
3.2.2.1 Implantate mit Zellen	45
3.2.2.2 Implantate ohne Zellen	46
3.3 14 Tage Liegezeit	47
3.3.1 Nach der Explantation	47

3.3.2	Lichtmikroskopie	47
3.3.2.1	Implantate mit Zellen	47
3.3.2.2	Implantate ohne Zellen	48
3.4	28 Tage Liegezeit	49
3.4.1	Nach der Explantation	49
3.4.2	Lichtmikroskopie	49
3.4.2.1	Implantate mit Zellen	49
3.4.2.2	Implantate ohne Zellen	50
3.5	84 Tage Liegezeit	51
3.5.1	Nach der Explantation	51
3.5.2	Lichtmikroskopie	51
3.5.2.1	Implantate mit Zellen	51
3.5.2.2	Implantate ohne Zellen	52
3.6	Histomorphometrie	53
3.6.1	Durchmesser der Vliesfasern	53
3.6.2	Länge des Knochenkontaktes	54
4	Diskussion	55
4.1	Das PGA/PLA Vlies als Trägerstruktur	55
4.2	Knochenzement in der osteochondralen Biphasen	59
4.3	Das Tiermodell	61
4.4	Ausblick	64
5	Zusammenfassung	65
6	Literatur	67
7	Anhang	78
7.1	Abbildungen des Ergebnissteils	78
7.2	Protokolle zu den Färbungen	99
7.3	Tabellen zur Histomorphometrie	101
7.3.1	Messdaten	101

8	Danksagung	103
9	Lebenslauf	104
10	Erklärung	105