

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie mit dem  
Arbeitsbereich Orthopädie am Campus Benjamin Franklin der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

---

DISSERTATION

Heterotope Chondrozyten und dreidimensionale Ko-Kulturen für den  
Einsatz in der autologen Gelenkknorpelrekonstruktion

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl. Ing. Karym Maher Massoud El Sayed  
aus Berlin

Gutachter/in:        1. PD Dr. med.-vet. Gundula Schulze-Tanzil  
                             2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Horst Claassen  
                             3. Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen

Datum der Promotion: 24.02.2012

## INHALT

Abkürzungen	1
Abstract	2
Einleitung	3
Zielstellung	3
Methoden	4
Chondrozytenisolierung und -kultur	4
RTD-PCR	4
Western-Blot	5
Immunzytochemie und Zellmarkierung	5
Vitalitäts-Assay	5
Quantitative Analysen	5
Xenograft-Nacktmausmodell	6
Histologische Analysen	6
Statistik	6
Ergebnisse	7
Das chondrogene Expressionsprofil heterotoper Chondrozyten in der Monolayer Kultur	7
Das chondrogene Potential heterotoper Chondrozyten in 3D Kulturmodellen	8
Chondrogenese heterotoper Chondrozyten im Xenograft-Nacktmausmodell	9
Koexistenz und wechselseitige Beeinflussung heterotoper Chondrozyten in Ko-Kulturen	9
Diskussion	10
Literatur	13
Anteilsklärung	17
Lebenslauf	18
Publikationsliste	20
Ausgewählte Publikationen	22
Characterization of auricular chondrocytes and auricular/articular chondrocyte co-cultures in terms of an application in articular cartilage repair.	23
PGA associated heterotopic chondrocyte co-cultures – implications of nasoseptal and auricular chondrocytes in articular cartilage repair?	31
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds.	43
Selbständigkeitserklärung	56
Danksagung	57

## ABKÜRZUNGEN

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
AB	Alcianblau
ABI	Applied Biosystems
APC	Allophycocyanin
CMTMR	(5-[6]-([(4-chloromethyl) benzoyl]amino)tetramethylrhodamine)
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein diacetate
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMMB	1,9-Dimethylmethylen Blau
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Fluoreszein diacetat
HE	Hämatoxylin Eosin
MACI	Matrix assistierte autologe Chondrozyten Implantation
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGA	Poly Glykolsäure
PI	Propidium Iodid
PTD-PCR	Real Time Detection-Polymerase Chain Reaction
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide Gel Elektrophorese
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (Gen)
SOX-9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (Protein)

## ABSTRACT

Die Matrix assistierte autologe Chondrozyten Implantation (MACI) stellt den momentanen Goldstandard zur Behandlung großer Gelenkknorpeldefekte dar. Der therapeutische Erfolg wird durch hohe Entnahmemorbiditäten sowie die geringe Verfügbarkeit von gesundem Spendergewebe stark limitiert. Falls adulte heterotope Knorpelzellen ein belastbares hyalines Ersatzgewebe generieren könnten, bestünde hier eine vielversprechende Modifikationsmöglichkeit der herkömmlichen MACI. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die vergleichende Charakterisierung artikulärer, aurikulärer und nasoseptaler Chondrozyten in zweidimensionalen (2D) und dreidimensionalen (3D) *in vitro* Kultursystemen sowie im *in vivo* Xenograft-Nacktmausmodell vorgenommen, um anschließend die Kompatibilität sowie die wechselseitige Beeinflussung heterotoper Chondrozyten in Ko-Kulturen (aurikulär/artikulär, nasoseptal/artikulär) zu untersuchen. Dabei wurden wichtige chondrogene Marker und extrazelluläre Matrix (EZM)-Bestandteile (Sox9, Aggrecan; Kollagene Typ I, II, IX, XI, Elastin, Lubricin,  $\beta$ 1-Integrin) mittels RTD-PCR-, Western Blot-, immunzytochemischer und quantitativer Analysen nachgewiesen. Die Knorpelneogenese in den *in vitro* und *in vivo* 3D Kulturen wurde (immun-) histologisch dargestellt. In der 2D Kultur wurde der Hauptknorpelmarker Kollagen Typ II in artikulären Chondrozyten höher exprimiert. Auch im 3D-Alginatkultursystem lag die Expression des Kollagens Typ II über den gesamten Untersuchungszeitraum unterhalb des Niveaus in den artikulären Chondrozyten. Die PGA-assoziierten Kulturen zeigten eine hohe Vitalität und eine umfangreiche EZM-Produktion. Bezüglich der Kollagen Typ II Expression konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den artikulären und den heterotopen Chondrozyten nachgewiesen werden. Die guten Kollagen Typ II/ I Ratios sprechen für eine erfolgreiche und mit artikulären Chondrozyten vergleichbare Redifferenzierung der heterotopen Chondrozyten in dem PGA-assoziierten Kultursystem. Im *in vivo* Xenograft-Nacktmausmodell konnte mit allen heterotopen Chondrozytenarten eine Bildung von hyalinartigem Knorpelgewebe erzielt werden. In den nasoseptalen Chondrozyten Kulturen wurde dabei eine stark ausgeprägte Ossifikation evident. Die Präsenz elastischer Fasern konnte jedoch in keiner Kultur nachgewiesen werden. Über eine Zell-Markierung wurde die Koexistenz der verschiedenen Chondrozytenarten 2D sowie 3D Ko-Kulturen bewiesen. Die in den PGA-assoziierten Ko-Kulturen im Vergleich zu den artikulären Mono-Kulturen günstigere Kollagen Typ II/ I Ratio deutet auf eine positive Wechselwirkung der heterotopen Chondrozyten hin. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Daten sprechen für die weitere Verwendung heterotoper Chondrozyten, im Besonderen aurikulärer Chondrozyten, in einem experimentellen Kontext der MACI.

## **EINLEITUNG**

Traumatische Gelenkknorpeldefekte münden aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels unbehandelt langfristig in einer post-traumatischen Arthrose, die mit einer erheblichen Belastung für den Patienten einhergeht. Der künstliche Gelenkersatz stellt dann häufig die *Ultima Ratio* dar [1]. Dabei bleibt die Entwicklung potenter Methoden zur Rekonstruktion defekter Gelenkknorpelareale eine der Hauptbemühungen der Wiederherstellungschirurgie [2-4]. Die Matrix assistierte autologe Chondrozyten Implantation (MACI), bei der patienteneigene, *in vitro* vermehrte artikulare (Gelenk-) Chondrozyten in Kombination mit einem resorbierbaren Biomaterial in den Gelenkknorpeldefekt implantiert werden, gilt momentan als therapeutischer Goldstandard für die Behandlung großer Gelenkknorpeldefekte [1, 5]. Die limitierte Verfügbarkeit von gesundem autologen Spendergewebe und die hohe Entnahmemorbidität begrenzen den kurativen Effekt [6]. Zudem verlieren die autologen Chondrozyten während der notwendigen *in vitro* Vermehrung ihren differenzierten Phänotyp, erkennbar an einer progressiv verminderten Expression spezifischer Knorpelmatrixproteine („Knorpelmarker“) [7-10]. Heterotope Chondrozyten des hyalinen Nasenseptums (nasoseptale Chondrozyten) oder des elastischen Ohrknorpels (aurikuläre Chondrozyten) sind bei deutlich geringerer Biopsieentnahmemorbidität zu gewinnen und weisen zudem ein hohes chondrogenes Potential auf [11-13]. Sie proliferieren *in vitro* vier Mal schneller als artikulare Chondrozyten. Darüber hinaus bleibt das Proliferationspotential nasoseptaler Chondrozyten bis in ein hohes Patientenalter erhalten [14-18]. Die Verwendung von gesundem heterotopen Knorpel als alternative oder ergänzende Zellquelle könnte die Erfolgsaussichten der herkömmlichen MACI deutlich verbessern und ihr Anwendungsspektrum um die Behandlung von älteren oder arthrotisch vorbelasteten Patienten erweitern [6].

## **ZIELSTELLUNG**

Als Basis für die spätere Etablierung von 3D Ko-Kulturen heterotoper artikulärer, aurikulärer und nasoseptaler Chondrozyten sollte zunächst eine vergleichende Charakterisierung erfolgen. Dabei sollte die Expression knorpelspezifischer Marker und anderer EZM-Komponenten *in vitro* sowie das chondrogene Potential der heterotopen Chondrozyten im *in vivo* Xenograft-Nacktmausmodell untersucht werden. Schließlich sollte die Zell-Zell-Kompatibilität sowie die über direkte Zell-Zell-Interaktion wechselseitig vermittelte chondrogene Differenzierung heterotoper Chondrozyten in verschiedenen *in vitro* Ko-Kultur-Ansätzen besondere Beachtung finden.

## **METHODEN**

### **Chondrozytenisolierung und -kultur**

Primäre humane Chondrozyten stammen aus hyalinen Gelenkknorpel (Femurkopf), der bei Gelenkersatz-Operationen abgetragen worden ist. Die hyalinen Nasenseptum-Chondrozyten wurden aus Gewebe, das im Zuge einer Nasenscheidewand-Korrektur entfernt wurde, isoliert. Die aurikulären Chondrozyten sind aus Ohrknorpel gewonnen worden, der während Korrekturoperationen von Dysplasien des äußeren Ohres entnommen werden musste. Die Zustimmung der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Verwendung dieser Gewebe lag vor (EA4/063/06 und EA4/050/06). Die primären porcinen heterotopen Chondrozyten stammen aus jeweils einem gleichen Donor-Tier (insgesamt 30 Tiere), welche im Rahmen von laufenden Tierversuchen anderer Arbeitsgruppen der Charité euthanasiert wurden. Die Knorpelzellen sind durch enzymatischen Verdau mit Pronase und Kollagenase aus der Knorpelmatrix freigesetzt worden. Für die Herstellung der 3D-Alginatkulturen wurden die Chondrozyten mit einer Zellkonzentration von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/mL in ein 2,5%iges Alginatgel verbracht. Für die Herstellung der 3D-PGA-Kulturen wurde eine Zellkonzentration von  $3,6 \times 10^4$  Zellen/mm<sup>3</sup> PGA-Scaffold verwendet. Die Ko-Kulturen wurden durch das Mischen der jeweiligen heterotopen Chondrozyten Subklassen zu gleichen Teilen (50/50) generiert.

### **RTD-PCR**

Die Untersuchung der Genexpression des Transkriptionsfaktors SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9), der EZM-Bestandteile Kollagen Typ I, II, IX, XI und Elastin (Col1A1, Col2A1, Col9A1, Col11A1, ELN), des Proteoglykans Lubricin (PRG4) sowie des Transmembranrezeptors  $\beta$ 1-Integrin (ITGB1) erfolgte nach Herstellerprotokollen mittels semi-quantitativer Real Time-Polymerase Chain Reaction (RTD-PCR). Als "housekeeping gene" wurde  $\beta$ -Aktin (ACTB) verwendet. Die gesamt-RNA wurde mittels eines RNeasy Mini Kit 250 isoliert (Qiagen, USA) und deren Konzentration am Spektralphotometer (NanoDrop 1000, Peqlab, DE) gemessen. Die Qualität der RNA wurde mittels RNA NanoChips am Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, USA) verifiziert. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mittels QuantiTect Reverse Transkription Kit<sup>®</sup> (Qiagen). Die RTD-PCR wurde mit dem Quantitec Probe PCR Kit (Qiagen) und dem TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Kit (Applied Biosystems [ABI], USA) mit jeweils spezifischen Primern (Quantitec Gene Expression Assays, Qiagen; TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, ABI) am Opticon 1 - Real-Time Cycler (Opticon<sup>™</sup> RTD-PCR, BioRad, DE) durchgeführt.

### **Western-Blot**

Zur vergleichenden Analyse der Proteinexpression in den heterotopen Chondrozyten wurden die Zellen mit einem Lysepuffer homogenisiert und die Gesamt-Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode und bovinem Serum Albumin als Standard bestimmt. Die Proteine in den Lysaten wurden mit Trichloressigsäure gefällt und in reduzierendem Proteinprobenpuffer aufgenommen. Im Weiteren erfolgte die Analyse des Transkriptionsfaktors SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX-9) und des Transmembranrezeptors  $\beta$ 1-Integrin in den Zelllysaten aller porcinen sowie humanen heterotopen Chondrozytenarten im standardisierten SDS-Page Western Blot System. Zur Detektion der Proteine wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper in Verbindung mit einer Chemilumineszenz-Lösung verwendet. Die Expressionsstärke wurde densitometrisch mit  $\beta$ -Aktin als „housekeeping protein“ ermittelt.

### **Immunzytochemie und Zellmarkierung**

Für immunzytochemische Färbungen wichtiger EZM-Bestandteile wurden entweder aus 3D-Kulturen Gefrierschnitte angefertigt oder auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen adhärente Zellen verwendet. Vor der Färbung wurden die Zellen mit einer Paraformaldehyd-Lösung fixiert und mit Eselserum blockiert. Schnitte von nativem Gewebe sowie *in vivo* Kulturen wurden zusätzlich mit Pronase demaskiert. Anschließend wurden die Proben mit den Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Zur Unterscheidung der verschiedenen heterotopen Zelltypen wurden verschiedene Zellmarker verwendet (CMTMR und CMFDA). Die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen erfolgte mikroskopisch, die der 3D-Alginatkulturen zusätzlich mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die zell-assoziierte Kollagen Typ II Expression in den 3D-Alginatkulturen wurde, nach Depolymerisation des Alginats mittels EDTA, durchflusszytometrisch am FACS-Calibur Flowzytometer gemessen.

### **Vitalitäts-Assay**

Um die Verteilung von vitalen und toten Chondrozyten in den PGA-Kulturen nachvollziehen zu können, wurden repräsentative Segmente der Kulturen mit Fluoreszeindiacetat (FDA) inkubiert, und tote Zellen im Anschluss mit dem Nukleinsäure-Interkalator Propidiumiodid (PI) gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

### **Quantitative Analysen**

Für die Bestimmung des Kollagengehaltes ist ein Hydroxyprolin-Assay angewandt worden [19]. Die Hydrolyse des Gewebes erfolgt über Nacht in 6 M HCl bei 105°C. Im Anschluss wurde das Hydrolysat mit Citratpuffer aufgenommen, und in Chloramin T, Perchlorsäure und



Dimethylaminobenzaldehyd inkubiert. Gemessen wurde die Absorption gegen L-Hydroxiprolin als Standard. Die Berechnung des Kollagengehaltes erfolgte mit dem Umrechnungsfaktor 7,1 [20]. Die Bestimmung des Proteoglykangehalts ist mit einem 1,9-Dimethylmethylen Blau (DMMB) Assay durchgeführt worden. Die Proben wurden mit Proteinase K 16 h bei 55°C verdaut und zentrifugiert. Nach dem Versetzen des Überstands mit der DMMB-Färbelösung ist ein Adsorptionsshift gegen Chondroitinsulfat als Standard gemessen worden. Der ermittelte Proteoglykangehalt wurde auf den DNA-Gehalt in den Proben bezogen. Dieser ist mit dem CyQuant<sup>®</sup> NF-Assay (Invitrogen, DE) und Kälberthymus DNA als Standard bestimmt worden.

### **Xenograft-Nacktmausmodell**

Porcine heterotope Chondrozyten wurden 21 Tage in einem dynamischen Kultursystem unter orbitaler Schüttelung bei 36 upm auf PGA-Scaffolds vorkultiviert. 6 mm durchmessende Knorpelkonstrukte wurden 4-8 Wochen alten weiblichen athymischen (Nackt-)Mäusen subkutan implantiert. Der Kontrollgruppe wurde unbesiedeltes PGA-Scaffold implantiert. Hierzu erfolgte als Prä- und Postmedikation eine subkutan Applikation von Rimadyl (4 mg/kg Körpergewicht). Für die Implantation erfolgte die Anästhesie mittels Isofluran-Inhalation (Forene 100%). Die Euthanasie der Tiere fand 1, 6 und 12 Wochen nach der Implantation statt (n = 4 pro Gruppe und Zeitpunkt). Für die makroskopische und mikroskopische bzw. histologische Beurteilung der Knorpelneogenese wurde ein eigens entworfenes Score System basierend auf O`Driscoll et al. [21] verwendet.

### **Histologische Analysen**

Zur histologischen Beurteilung der EZM- und Zell-Verteilung in den Knorpelkonstrukten wurden Hämatoxylin / Eosin (HE) Übersichtsfärbungen angefertigt. Der Nachweis der knorpelspezifischen Proteoglykane und deren Verteilung erfolgte über Alcianblau (AB) Färbungen. Elastische Fasern wurden mittels Resorcin-Fuchsin-Färbungen nach Hart/Weigert dargestellt. Zum Nachweis einer eventuellen Ossifikation des gebildeten Knorpelgewebes dienten von Kossa-Färbungen.

### **Statistik**

Die Ergebnisse der Analysen der heterotopen Chondrozyten wurden mit Bezug auf die Gelenk Chondrozyten Kulturen normalisiert. Die Ermittlung der Signifikanzen erfolgte über den Student's t-Test (Analysen mit humanen Chondrozyten: ungepaart, zweiseitig; porcine Proben: gepaart, zweiseitig) mit einem festgelegten Konfidenzintervall von  $p \leq 0,05$ .

## **ERGEBNISSE**

### **Das chondrogene Expressionsprofil heterotoper Chondrozyten in der Monolayer Kultur**

Die Untersuchungen des Hauptknorpelmarkers Kollagen Typ II zeigten auf RNA Ebene in beiden Spezies signifikant niedrigere Expressionslevel in den aurikulären und nasoseptalen Chondrozyten im Vergleich zu den artikulären Chondrozyten. In den porcinen Chondrozyten wurden diese Ergebnisse zusätzlich immunzytochemisch verifiziert. Die Genexpression weiterer Kollagene wurde in humanen nasoseptalen im Vergleich zu artikulären Chondrozyten näher untersucht. Kollagen Typ IX wurde in nasoseptalen signifikant stärker exprimiert, wohingegen die Expression von Kollagen Typ XI in nasoseptalen gegenüber artikulären Chondrozyten keine signifikanten Unterschiede aufwies. Immunzytochemisch konnte die Expression von Aggrecan in den porcinen Kulturen aller Chondrozyten Subklassen gleichermaßen nachgewiesen werden.

Der chondrogene Transkriptionsfaktor SOX-9 ist für die Chondrogenese von fundamentaler Bedeutung. Er induziert die Expression der für die Funktionalität von hyalinem Knorpelgewebe entscheidenden EZM-Proteine wie der Kollagene des Typs II, IX und XI und des in Knorpelgewebe dominierenden Proteoglykans, Aggrekan [22]. In den humanen aurikulären Chondrozyten lag die SOX9 Genexpression in etwa auf dem Niveau der artikulären Chondrozyten. In aurikulären Chondrozyten porcinen Ursprungs wurde hingegen eine deutlich geringere Gen- und Proteinexpression des Transkriptionsfaktors als in artikulären Chondrozyten nachgewiesen. In nasoseptalen Chondrozyten beider Spezies wurde das SOX9 Gen signifikant schwächer als in artikulären Chondrozyten exprimiert. Kollagen Typ I gilt bei der *in vitro* Kultivierung von Chondrozyten als Dedifferenzierungsmarker und wurde aus diesem Grund ebenfalls untersucht. Auf Gen- und Proteinebene wurde Kollagen Typ I in allen Chondrozytenarten in etwa gleich stark exprimiert. Einzig die porcinen aurikulären Chondrozyten wiesen eine signifikant niedrigere Kollagen Typ I Genexpression auf. Das vorwiegend im elastischen Knorpel vertretene Elastin Gen wurde signifikant stärker in aurikulären Chondrozyten Kulturen exprimiert.

Für die Reduktion der zwischen artikulierenden Gelenkknorpelflächen auftretenden Reibung - und damit maßgeblich für die Funktionalität des Gelenks verantwortlich - ist die Produktion von Lubricin. In beiden humanen heterotopen Chondrozytenarten konnte die Expression von Lubricin auf einem im Vergleich zu artikulären Chondrozyten signifikant niedrigeren Niveau nachgewiesen werden.

### **Das chondrogene Potential heterotoper Chondrozyten in 3D Kulturmodellen**

Um die Redifferenzierung und Chondrogenese heterotoper Chondrozyten in 3D Kultursystemen zu untersuchen, wurde zunächst eine Verkapselung von porcinen aurikulären und artikulären Chondrozyten in einem Alginatgel vorgenommen. Bei der konfokal mikroskopischen Betrachtung zeigte sich sowohl in aurikulären wie auch in artikulären 3D-Alginatkulturen eine stark ausgeprägte Kollagen Typ II Produktion. Bei der durchflusszytometrischen Analyse lag das Expressionsniveau des Zelloberflächen anhaftenden Kollagen Typ II in den artikulären Kulturen über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant höher als in aurikulären Chondrozyten Kulturen. Jedoch spricht die deutliche Expression des Knorpelmarkers für eine erfolgreiche Redifferenzierung beider Chondrozyten Subklassen in der 3D-Alginatkultur.

Um das Verhalten der heterotopen Chondrozyten in einem der praktischen Anwendung näheren Kulturmodell zu untersuchen, wurden die Zellen auf PGA-Scaffolds kultiviert. Alle Chondrozyten Kulturen zeigten in den Vitalitäts-Assays eine hohe Vitalität. Auch knorpelspezifische Proteoglykane konnten in allen Kulturen mittels einer AB Färbung nachgewiesen werden sowie eine für Knorpelgewebe charakteristische Lakunenbildung, was auf eine erfolgreiche Redifferenzierung in der PGA-assoziierten Kultur hindeutet. Die Kollagen Typ II Expression wurde immunhistochemisch nachgewiesen, wobei sowohl aurikuläre als auch nasoseptale Chondrozyten eine mit artikulären Chondrozyten vergleichbare Expression des Matrixproteins zeigten. Auch der Dedifferenzierungsmarker Kollagen Typ I wurde in allen Chondrozyten Kulturen ähnlich stark exprimiert. Bei der Betrachtung des Kollagen Typ II / Typ I Verhältnisses zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Quantifizierung der EZM-Synthese zeigte, dass sowohl der Kollagen- als auch der Proteoglykangehalt in den Proben vom 7 d zum 21 d stetig anstieg. Zwischen den heterotopen Chondrozyten Kulturen waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen, einzig die aurikulären Kulturen zeigten am 14 d einen signifikant erhöhten Proteoglykangehalt im Vergleich zu den nasoseptalen Kulturen. Zusammenfassend zeigten sowohl aurikuläre Chondrozyten wie auch nasoseptale Chondrozyten im PGA-assoziierten Kulturmodell ein hohes chondrogenes Potential. Die EZM-Produktion konnte durch die histologische wie auch über die immunzytochemischen Färbungen als hyalin-ähnlich verifiziert werden. Eine erfolgreiche Redifferenzierung der heterotopen Chondrozyten in diesem 3D Kulturmodell war zudem anhand der günstigen Kollagen Typ II / Typ I Ratio zu erkennen.

### **Chondrogenese heterotoper Chondrozyten im Xenograft-Nacktmausmodell**

Die *de novo* Chondrogenese der heterotopen Chondrozyten konnte im *in vivo* Xenograft-Nacktmausmodell untersucht werden. Alle aus der Maus explantierten heterotopen Chondrozyten Kulturen zeigten im Gegensatz zu den unbesiedelten PGA-Scaffolds eine deutliche Chondrogenese. Bei der Betrachtung des makroskopischen Erscheinungsbildes und der Größenreduktion schnitten aurikuläre Chondrozyten Kulturen am besten ab. Im Vergleich zu den artikulären Kulturen war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant, wohingegen die nasoseptalen Chondrozyten Kulturen häufiger eine Größenreduktion und schlechtere makroskopische Score Werte aufwiesen. Die histologische Qualität aller heterotopen Kulturen blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant gut. Immunzytochemisch konnte eine in allen heterotopen Chondrozyten Kulturen gleichermaßen deutlich erkennbare Kollagen Typ II Expression verzeichnet werden, so dass auch im Xenograft-Nacktmausmodell das ausgeprägte chondrogene Potential der heterotopen Chondrozyten deutlich wurde.

Bei der Betrachtung der histologischen Scores konnten nach 1 und 12 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen den heterotopen Chondrozyten Kulturen gefunden werden. Zu dem 6 Wochen Zeitpunkt zeigte sich in den aurikulären Kulturen im Vergleich zu den nasoseptalen und artikulären Kulturen ein signifikant besseres histologisches Bild. Dabei konnte in allen Chondrozyten Kulturen eine ausgeprägte Lakunenbildung und eine proteoglykanreiche EZM dargestellt werden, die jedoch über den Versuchsverlauf zunehmend regressiven Veränderungen unterlag. So konnten nach 12 Wochen zellfreie Matrix-Areale in den aurikulären und artikulären Kulturen beobachtet werden. In den nasoseptalen Kulturen wurden mit Knochenmark-ähnlichem Gewebe gefüllte Hohlräume in der EZM gefunden, als Zeichen einer fortschreitenden enchondralen Ossifikation. Eine kalzifizierende Matrix konnte vereinzelt in stark abgeschwächter Form auch in den aurikulären Chondrozyten Kulturen zum 12 Wochen Zeitpunkt und in den artikulären Chondrozyten Kulturen zum 6 Wochen Zeitpunkt festgestellt werden. Die Ossifikation zeichnete sich durch hypertrophe Chondrozyten mit kalzifizierender EZM und z.T. in Lakunen liegenden Osteozyten-ähnlichen Zellen aus. Zudem konnte eine beginnende Blutgefäß-Einsprossung beobachtet werden. Elastinfasern wurden in den Chondrozyten Kulturen nicht nachgewiesen.

### **Koexistenz und wechselseitige Beeinflussung heterotoper Chondrozyten in Ko-Kulturen**

Die Koexistenz der unterschiedlichen Chondrozytenarten konnte sowohl in den 2D wie auch 3D Ko-Kulturen mittels einer Markierung mit Zellmarkern nachgewiesen werden. Im Verlauf der 2D Ko-Kultur Experimente mit porcinen aurikulären und artikulären Chondrozyten wurden auf Gen- sowie auf Proteinexpressionsebene im Vergleich zu der artikulären Mono-

Kultur keine signifikanten positiven Wechselwirkungen sichtbar. In der 3D-Alginat-Ko-Kultur konnte ebenfalls keine signifikante positive Beeinflussung über direkte Zell-Zell-Kontakte oder lösliche Mediatoren nachgewiesen werden. Hier lag das Expressionsniveau des Zelloberflächen-anhaftenden Kollagen Typ II in etwa auf dem der aurikulären Mono-Kulturen und deutlich unterhalb des Niveaus der artikulären Mono-Kulturen. In den PGA-Scaffold-assoziierten Ko-Kulturexperimenten mit porcinen heterotopen Chondrozyten hingegen konnte in allen Ko-Kulturen im Vergleich mit den artikulären Mono-Kulturen eine höhere Kollagen Typ II Expression nachgewiesen werden. Zusammen mit der deutlich verbesserten Kollagen Typ II / Typ I Ratio in den Ko-Kulturen liegt eine positive wechselseitige Beeinflussung der artikulären Chondrozyten durch die ko-kultivierten heterotopen Chondrozyten nahe.

## **DISKUSSION**

Die bei der vergleichenden Charakterisierung der Expression des Hauptknorpelmarkers Kollagen Typ II aufgetretenen Unterschiede in den 2D Kulturen lassen artikuläre Chondrozyten vorerst als zu präferierende Zellquelle erscheinen. Nach der Überführung in das PGA-Scaffold-assoziierte Kultursystem ist in den heterotopen im Vergleich zu den artikulären Chondrozyten Kulturen keine niedrigere Kollagen Typ II Expression mehr nachzuweisen. So kann in Bezug auf ein anwendungsnahes 3D Kultursystem davon ausgegangen werden, dass trotz der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten unterschiedlichen Expressionsprofile alle der untersuchten Knorpelarten für einen experimentellen Einsatz in der Gelenkheilung in Frage kämen. Ein weiteres entscheidendes Kriterium ist dabei die Genexpression von Lubricin. Die in der Arbeit verwendeten Chondrozyten stammen aus Knorpelarten, welche von einem Perichondrium umgeben sind und somit *in situ* keine Lubricin Schicht auf der Gewebeoberfläche ausbilden. Die Expression dieses für die Gelenkfunktion fundamentalen Proteins kann jedoch in heterotopen Chondrozyten (nasoseptal) über eine mechanische Stimulation induziert werden [23]. Demnach stellt die geringe Lubricin-Genexpression in den heterotopen Chondrozyten kein absolutes Ausschlusskriterium für ihre Verwendung zum Gelenkknorpelersatz dar.

Aurikuläre sowie nasoseptale Chondrozyten zeigten in den verwendeten 3D Kulturmodellen ein ausgeprägtes chondrogenes Potential, welches in der Literatur, wenn auch in abweichenden Kulturmodellen, ähnlich beschrieben wurde (Zur Übersicht El Sayed et al. 2010) [6, 12-15, 24-31]. Im Gegensatz zu der 2D Monolayer Kultur ergaben sich in den 3D Kulturen von heterotopen Chondrozyten hinsichtlich der Kollagen Typ II Expression keine signifikanten Unterschiede. Auf Grund der in allen *in vitro* 3D Mono- sowie Ko-Kulturen nachweisbaren guten Knorpelqualität kann von einer erfolgreichen und mit artikulären

Chondrozyten vergleichbaren Redifferenzierung ausgegangen werden. Die *in vitro* Herstellung von Ersatzgewebe kann somit auch mittels heterotoper aurikulärer und nasoseptaler Chondrozyten Mono-Kulturen wie auch durch deren Ko-Kultivierung mit artikulären Chondrozyten erfolgreich durchgeführt werden.

Auch im *in vivo* Xenograft-Nacktmausmodell gelang es, mit allen verwendeten Chondrozytenarten ein hyalinartiges Gewebe zu bilden. Auf Grund des hyalinen Charakters des ursprünglichen Donor-Gewebes erscheint nasoseptaler Knorpel im Vergleich zum elastischen aurikulärem Knorpel als Gewebequelle zunächst naheliegender. Dabei zeigten in der Arbeit die aurikulären Kulturen zum 6 Wochen Zeitpunkt das beste histologische Erscheinungsbild. Ebenso muss die in den *in vivo* Versuchen aufgetretene ausgeprägte Ossifikation des durch nasoseptale Chondrozyten gebildeten Knorpelgewebes kritisch betrachtet werden. Aus der Literatur ist die Formation von Nodulen während der 2D Kultivierung von nasoseptalen Chondrozyten der Ratte bekannt [32, 33]. Diese sind kalzifizierende Areale, in denen eine gesteigerte Kollagen Typ X Expression zu finden ist. *In vivo* wird Kollagen Typ X vorwiegend von alternden Chondrozyten gebildet, was im Folgenden zur Hypertrophie und zur Ossifikation des Gewebes führt [33]. In bisherigen Arbeiten, die nasoseptale Chondrozyten im Xenograft-Nacktmausmodell verwendeten, konnte jedoch keine Ossifikation in den entstandenen Geweben verzeichnet werden [25, 26, 29]. Nur in bovinen kostalen Chondrozyten Kulturen konnten Kusuhara et al. eine stark ausgeprägte Ossifikation nachweisen [26]. Da eine geringe Kalzifizierung auch vereinzelt in dem durch aurikuläre sowie artikuläre Chondrozyten gebildeten Gewebe verzeichnet werden konnte, bleibt unklar, ob die auftretende osteogene Differenzierung ein Charakteristikum der zugrunde liegenden Gewebedonorspezies sowie des verwendeten Scaffolds in Kombination mit dem Xenograft-Nacktmausmodell ist. In Betracht kommt sicherlich auch die stark abweichende biomechanische Belastung des Implantates bei dorsal-subkutaner Lokalisation, verglichen mit dem Einsatz im chondralen Gelenkdefekt. Durch die fehlende Belastung kommt es nicht zu den Walkvorgängen, die für die Nährstoffversorgung notwendig sind. Dieser Umstand führte möglicherweise bei steigender EZM-Dichte zu einer Unterversorgung bestimmter Gewebeareale und somit zur Hypertrophie der lokalen Zellen, was eine Erklärung für die nachgewiesenen zellfreien Areale sein könnte und möglicherweise eine Ossifikation induzierte. In tierexperimentellen Studien mit nasoseptalen sowie kostalen Chondrozyten in osteochondralen Defektmodellen im Kaninchen konnte beispielsweise eine Defektdeckung mit hyalinartigem Ersatzgewebe, ohne Ossifikationen im chondralen Bereich, erzielt werden [34-37]. Bisher nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe aus einem osteochondralen Gelenk-

defektmodell im Kaninchen, bei dem aurikuläre Chondrozyten auf PGA-Scaffolds zur Defektdeckung verwendet wurden, zeigten ebenfalls keine Ossifikation im chondralen Bereich des gebildeten hyalinartigen Ersatzgewebes.

Daher erscheinen aurikuläre Chondrozyten nach der *in vivo* Evaluation der heterotopen Chondrozyten als günstigste Zellquelle. Um eine endgültige Aussage über die Eignung aurikulärer Chondrozyten treffen zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen - beispielsweise zur biomechanischen Qualität des durch heterotope Chondrozyten gebildeten Gewebes - nötig.

Die bei der Ko-Kultivierung heterotoper Chondrozyten erhaltenen Ergebnisse legen eine wechselseitige Beeinflussung der verschiedenen Chondrozyten Subklassen nahe. Vor allem in PGA-assoziierten Kulturen konnte eine - wenn auch nicht signifikante - Verbesserung der Kollagen Typ II / Typ I Ratio beobachtet werden. Dies spricht für eine effektive und möglicherweise verbesserte Redifferenzierung. Aus anderen Studien ist bekannt, dass die Ko-Kultivierung primärer Chondrozyten mit bereits passagierten Chondrozyten eine stabile Redifferenzierung bewirken kann [38-41]. Dabei zeigt sich, dass die chondrogen stimulatorischen Effekte bei der Ko-Kultivierung mit primären Chondrozyten auch spezies-übergreifend (bovin zu human) zu beobachten sind [39]. Weitere Arbeiten konnten die Beeinflussung der Chondrogenese in 3D Kultursystemen durch die Ko-Kultivierung mit primären Chondrozyten nachweisen. Beispielsweise bewirkt die indirekte Ko-Kultivierung von in Agarose eingebetteten Chondrozyten 3D Kulturen mit einer sogenannten „Feeder Zellschicht“ aus primären Chondrozyten nach 28 Tagen Kultur eine signifikante Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Knorpelgewebes. Zudem konnte eine verbesserte Kollagen Typ II Proteinexpression und ein erhöhter Kollagen- sowie Proteoglykangehalt nachgewiesen werden [42]. Die genauen Interaktionen bleiben jedoch weitestgehend ungeklärt. Bis dato wurde auch nicht die Auswirkung einer direkten Ko-Kultivierung heterotoper Chondrozyten *in vivo* untersucht. Hierzu können die in der Arbeit im *in vivo* Nacktmausmodell generierten Daten als Basis herangezogen werden.

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit zu Grunde liegenden Ergebnisse spricht für die Einsatzmöglichkeit heterotoper Chondrozyten im Kontext der MACI, wobei in dieser Studie aurikuläre Chondrozyten als die zu präferierende Zellart hervorgingen. Bevor ein klinischer Einsatz gerechtfertigt werden kann, müssen jedoch noch weitere *in vivo* Versuche im Klein- und Großtiermodell folgen.

## LITERATUR

- 1 Hunziker EB, *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis and Cartilage, 2002. 10(6): p. 432-63.
- 2 Niemeyer P, Kreuz PC, Steinwachs M, et al., *[Operative treatment of cartilage lesions in the knee joint]*. Sportverletz Sportschaden, 2007. 21(1): p. 41-50.
- 3 Pachalski A and Franczuk B, *The development of early, biological concepts, techniques, and methods for joint reconstruction*. Ortop Traumatol Rehabil, 2004. 6(4): p. 406-15.
- 4 Williams GM, Lin JW and Sah RL, *Cartilage reshaping via in vitro mechanical loading*. Tissue Eng Part A, 2007. 13(12): p. 2903-11.
- 5 Marlovits S, Zeller P, Singer P, et al., *Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation*. Eur J Radiol, 2006. 57(1): p. 24-31.
- 6 El Sayed K, Haisch A, John T, et al., *Heterotopic Autologous Chondrocyte Transplantation-A Realistic Approach to Support Articular Cartilage Repair?* Tissue Eng Part B Rev, 2010. 16(6): p. 603-16.
- 7 Benya PD and Shaffer JD, *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. Cell, 1982. 30(1): p. 215-24.
- 8 Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, et al., *Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads*. Matrix, 1992. 12(2): p. 116-29.
- 9 Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, et al., *Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures*. Cell Tissue Res, 2002. 308(3): p. 371-9.
- 10 Schulze-Tanzil G, Mobasher A, de Souza P, et al., *Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2004. 12(6): p. 448-58.
- 11 Togo T, Utani A, Naitoh M, et al., *Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction*. Lab Invest, 2006. 86(5): p. 445-57.
- 12 Van Osch GJ, Mandl EW, Jahr H, et al., *Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering*. Biorheology, 2004. 41(3-4): p. 411-21.
- 13 Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, et al., *Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes*. Tissue Eng Part A, 2002. 8(5): p. 817-26.



- 14 Henderson JH, Welter JF, Mansour JM, et al., *Cartilage tissue engineering for laryngotracheal reconstruction: comparison of chondrocytes from three anatomic locations in the rabbit*. Tissue Eng Part A, 2007. 13(4): p. 843-53.
- 15 Xu JW, Zaporozhan V, Peretti GM, et al., *Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources*. Plast Reconstr Surg, 2004. 113(5): p. 1361-71.
- 16 Panossian A, Ashiku S, Kirchhoff CH, et al., *Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering*. Plast Reconstr Surg, 2001. 108(2): p. 392-402.
- 17 Vetter U, Pirsig W, Helbing G, et al., *Patterns of growth in human septal cartilage: a review of new approaches*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 1984. 7(1): p. 63-74.
- 18 Farhadi J, Fulco I, Miot S, et al., *Precultivation of engineered human nasal cartilage enhances the mechanical properties relevant for use in facial reconstructive surgery*. Ann Surg, 2006. 244(6): p. 978-85; discussion 985.
- 19 Stegemann H and Stalder K, *Determination of hydroxyproline*. Clin. Chim. Acta, 1967. 18(2): p. 267-73.
- 20 Homicz MR, McGowan KB, Lottman LM, et al., *A compositional analysis of human nasal septal cartilage*. Arch Facial Plast Surg, 2003. 5(1): p. 53-8.
- 21 O'Driscoll SW, Keeley FW and Salter RB, *Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year*. J Bone Joint Surg Am, 1988. 70(4): p. 595-606.
- 22 Lin Z, Willers C, Xu J, et al., *The chondrocyte: biology and clinical application*. Tissue Eng Part B Rev, 2006. 12(7): p. 1971-84.
- 23 Candrian C, Vonwil D, Barbero A, et al., *Engineered cartilage generated by nasal chondrocytes is responsive to physical forces resembling joint loading*. Arthritis Rheum, 2008. 58(1): p. 197-208.
- 24 Chung C, Erickson IE, Mauck RL, et al., *Differential behavior of auricular and articular chondrocytes in hyaluronic acid hydrogels*. Tissue Eng Part A, 2008. 14(7): p. 1121-31.
- 25 Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, et al., *Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures*. Tissue Eng Part A, 2006. 12(4): p. 691-703.
- 26 Kusuhara H, Isogai N, Enjo M, et al., *Tissue engineering a model for the human ear: assessment of size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes*. Wound Repair Regen, 2009. 17(1): p. 136-46.
- 27 Zhang L and Spector M, *Comparison of three types of chondrocytes in collagen scaffolds for cartilage tissue engineering*. Biomedical materials, 2009. 4(4): p. 045012.

- 28 Malicev E, Kregar-Velikonja N, Barlic A, et al., *Comparison of articular and auricular cartilage as a cell source for the autologous chondrocyte implantation*. J Orthop Res, 2009. 27(7): p. 943-8.
- 29 Naumann A, [Cartilage grafts generated by tissue engineering. *Histomorphological, immunochemical and biomechanical properties*]. HNO, 2008. 56(2): p. 109-21.
- 30 Zhang L and Spector M, *Comparison of three types of chondrocytes in collagen scaffolds for cartilage tissue engineering*. Biomed Mater, 2009. 4(4): p. 045012.
- 31 Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, et al., *Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes*. Tissue Eng Part A, 2004. 10(5-6): p. 762-70.
- 32 Loty S, Foll C, Forest N, et al., *Association of enhanced expression of gap junctions with in vitro chondrogenic differentiation of rat nasal septal cartilage-released cells following their dedifferentiation and redifferentiation*. Arch Oral Biol, 2000. 45(10): p. 843-56.
- 33 Kergosien N, Sautier J and Forest N, *Gene and protein expression during differentiation and matrix mineralization in a chondrocyte cell culture system*. Calcif Tissue Int, 1998. 62(2): p. 114-21.
- 34 Vinatier C, Gauthier O, Masson M, et al., *Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2009. 89(1): p. 176-85.
- 35 Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, et al., *An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects*. Biotechnol Bioeng, 2009. 102(4): p. 1259-67.
- 36 Szeparowicz P, Popko J, Sawicki B, et al., *Is the repair of articular cartilage lesion by costal chondrocyte transplantation donor age-dependent? An experimental study in rabbits*. Folia Histochem Cytobiol, 2006. 44(3): p. 201-6.
- 37 Szeparowicz P, Popko J, Sawicki B, et al., *Comparison of cartilage self repairs and repairs with costal and articular chondrocyte transplantation in treatment of cartilage defects in rats*. Roczn Akad Med Białymst, 2004. 49 Suppl 1: p. 28-30.
- 38 Ahmed N, Gan L, Nagy A, et al., *Cartilage tissue formation using redifferentiated passaged chondrocytes in vitro*. Tissue Eng Part A, 2009. 15(3): p. 665-73.
- 39 Ahmed N, Taylor DW, Wunder J, et al., *Passaged human chondrocytes accumulate extracellular matrix when induced by bovine chondrocytes*. J Tissue Eng Regen Med, 2010. 4(3): p. 233-41.
- 40 Taylor DW, Ahmed N, Gan L, et al., *Proteoglycan and collagen accumulation by passaged chondrocytes can be enhanced through side-by-side culture with primary chondrocytes*. Tissue Eng Part A, 2010. 16(2): p. 643-51.

41 Gan L and Kandel RA, *In vitro cartilage tissue formation by Co-culture of primary and passaged chondrocytes*. Tissue Eng Part A, 2007. 13(4): p. 831-42.

42 Tan AR, Dong EY, Andry JP, et al., *Coculture of Engineered Cartilage With Primary Chondrocytes Induces Expedited Growth*. Clin Orthop Relat Res, 2011.

## ANTEILSERKLÄRUNG

Der Promovend Karym El Sayed hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### Publikation 1

Kuhne M, John T, **El Sayed K**, Marzahn U, Aue A, Kohl B, Stoelzel K, Ertel W, Blottner D, Haisch A, Schulze-Tanzil G. Characterization of auricular chondrocytes and auricular/articular chondrocyte co-cultures in terms of an application in articular cartilage repair. Int J Mol Med. 2010 May; 25(5):701-8.

Anteil: 35%

Beitrag im Einzelnen: Isolierung und Kultivierung der Chondrozyten, Planung und Durchführung aller angewendeten Methoden, statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit am Manuskript.

### Publikation 2

**El Sayed K**, Marzahn U, John T, Hoyer M, Zreiqat H, Witthuhn A, Kohl B, Haisch A, Schulze-Tanzil G. PGA associated heterotopic chondrocyte co-cultures – implications of nasoseptal and auricular chondrocytes in articular cartilage repair? J Tissue Eng Regen M 2011; ahead of print.

Anteil: 70%

Beitrag im Einzelnen: Isolierung und Kultivierung der Chondrozyten, vollständige Planung und Durchführung aller angewendeten Methoden, statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, überwiegende Mitarbeit am Manuskript.

### Publikation 3

Lohan A, Marzahn U, **El Sayed K**, Haisch A, Kohl B, Ertel W, Müller RD, Schulze-Tanzil G, John T. In vitro and in vivo neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds. Histochem Cell Biol 2011; ahead of print.

Anteil: 35%

Beitrag im Einzelnen: Isolierung und Kultivierung der Chondrozyten, Ausführung der Tierexperimente, Planung und Durchführung aller angewendeten Methoden, statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit am Manuskript.

---

PD Dr. med.-vet. Gundula Schulze-Tanzil  
(Doktormutter)

---

Dipl.-Ing. Karym El Sayed  
(Doktorand)

## **LEBENS LAUF**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

Kuhne M, John T, El Sayed K, Marzahn U, Aue A, Kohl B, Stoelzel K, Ertel W, Blottner D, Haisch A, Schulze-Tanzil G.

***Characterization of auricular chondrocytes and auricular/articular chondrocyte co-cultures in terms of an application in articular cartilage repair.***

*International Journal of Molecular Medicine 2010 May; 25(5):701-8*

Impact Factor: 1,814

El Sayed K, Marzahn U, John T, Hoyer M, Zreiqat H, Witthuhn A, Kohl B, Haisch A, Schulze-Tanzil G.

***PGA associated heterotopic chondrocyte co-cultures – implications of nasoseptal and auricular chondrocytes in articular cartilage repair?***

*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2011; im Druck*

Impact Factor: 3,534

Lohan A, Marzahn U, El Sayed K, Haisch A, Kohl B, Ertel W, Müller RD, Schulze-Tanzil G, John T.

***In vitro and in vivo neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds.***

*Histochemistry and Cell Biology 2011 Jul;136(1):57-69.*

Impact Factor: 4,727

**Characterization of auricular chondrocytes and auricular/articular chondrocyte co-cultures in terms of an application in articular cartilage repair.**

Kuhne M, John T, El Sayed K, Marzahn U, Aue A, Kohl B, Stoelzel K, Ertel W, Blottner D, Haisch A, Schulze-Tanzil G.

*International Journal of Molecular Medicine 2010 May; 25(5):701-8.*

**PGA associated heterotopic chondrocyte co-cultures – implications of nasoseptal and auricular chondrocytes in articular cartilage repair?**

**El Sayed K**, Marzahn U, John T, Hoyer M, Zreiqat H, Witthuhn A, Kohl B, Haisch A, Schulze-Tanzil G.

*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2011 Nov; im Druck.*



***In vitro* and *in vivo* neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds.**

Lohan A, Marzahn U, El Sayed K, Haisch A, Kohl B, Ertel W, Müller RD, Schulze-Tanzil G, John T.

*Histochemistry and Cell Biology* 2011 Jul;136(1):57-69.

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

„Ich, Karym El Sayed, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Heterotope Chondrozyten und dreidimensionale Ko-Kulturen für den Einsatz  
in der autologen Gelenkknorpelrekonstruktion**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter FRAU PD DR. GUNDULA SCHULZE-TANZIL. Ihr Vertrauen und ihre fortwährende Unterstützung haben mir diese Arbeit erst ermöglicht. In den letzten drei Jahren war sie mir eine Mentorin, die mich unermüdlich gefordert und gefördert hat und von der ich letztendlich unschätzbar viel gelernt habe.

Ich möchte weiterhin PD DR. ANDREAS HAISCH, für die initiale Bereitstellung der Ko-Kultur Thematik so wie seiner konstruktiv eingebrachten Expertise aus dem Bereich der klinischen und experimentellen HNO, danken.

Ebenfalls möchte ich mich für die klinische Expertise aus der Unfallchirurgie von DR. THILO JOHN bedanken, der es mir ermöglichte in diesem Verbundprojekt ein Bindeglied zwischen den beiden medizinischen Fachrichtungen zu knüpfen.

Frau DIPL. ING. ULRIKE MARZAHN gilt mein Dank für ihre Unterstützung in dieser Arbeit und bei der Betreuung der beteiligten Studenten. Diese stellte für mich in dem gesamten Projekt eine außerordentliche Hilfe dar.

Herr BENJAMIN KOHL möchte ich an dieser Stelle besonderen Dank aussprechen, da seine enorme technische Begabung sowie sein unermüdlicher Wille und seine Geduld in unserer Zusammenarbeit für mich stets unverzichtbar waren und es bis heute noch sind.

Den an diesem großen Projekt beteiligten Studenten ANNEKATRIN AUE, ANNETT WITTHUN und MARIANN HOYER möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

All denen, die an diesem Projekt beteiligt waren, hier jedoch nicht namentlich aufgeführt wurden, gilt ebenso mein herzlichster Dank für die vielfältige Unterstützung.

Meiner Mutter und meinem Vater möchte ich an dieser Stelle speziellen Dank aussprechen, da sie es mir ermöglicht haben diesen Weg zu gehen.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Lebensgefährtin für ihre moralische Unterstützung, ihren Beistand und ihr Verständnis bedanken, welche für mich die größte Motivation zur erfolgreichen Beendigung dieser Arbeit darstellten.