

Aus der  
Klinik für Unfall- Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
der Universität zu Hamburg  
Direktor: Prof. Dr. J. M. Rueger

**Untersuchung über das  
Heilungsverhalten von hyalinem Knorpel  
in vitro, ex vivo sowie in Kombination**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Universität zu Hamburg

vorgelegt von

Wibke Dömeland  
aus Sindelfingen  
Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 30.05.2005

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. N. Meenen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Morlock

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Amling

**Meiner Mutter  
und  
meiner Schwester gewidmet**

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Knorpel</b>	<b>3</b>
<b><u>1.1.1</u></b>	<b><u>Allgemeiner Knorpelaufbau</u></b>	<b>3</b>
1.1.1.1	Chondrozyten	4
1.1.1.2	Extrazelluläre Matrix	5
1.1.1.3	Hyaliner Knorpel	7
1.1.1.3.1	Makroskopischer Aufbau	8
1.1.1.3.2	Biomechanik des Knorpels	8
1.1.1.3.3	Mikroskopischer Aufbau	8
1.1.1.4	Elastischer Knorpel	10
1.1.1.5	Faserknorpel	11
<b><u>1.1.2</u></b>	<b><u>Allgemeine Knorpelheilung in vivo</u></b>	<b>12</b>
1.1.2.1	Knorpelheilung nach Mikrotraumatisierung	14
1.1.2.2	Knorpelheilung nach oberflächlicher Läsion	14
1.1.2.3	Knorpelheilung nach osteochondralem Defekt	15
<b><u>1.1.3</u></b>	<b><u>Verhalten von Chondrozyten in Kultur</u></b>	<b>16</b>
<b><u>1.1.4</u></b>	<b><u>Altersbedingte Veränderungen des Gelenkknorpels</u></b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Therapien von Knorpeldefekten</b>	<b>19</b>
<b><u>1.2.1</u></b>	<b><u>Konventionelle Therapien</u></b>	<b>19</b>
1.2.1.1	Gelenkspülung (Lavage)	19
1.2.1.2	Shaving	20
1.2.1.3	Osteotomien	21
1.2.1.4	Subchondrale Stimulation	21
1.2.1.5	Pridie-Bohrung	21
1.2.1.6	“Microfracture” –Technik	22
<b><u>1.2.1.7</u></b>	<b><u>Injektionen</u></b>	<b>22</b>
1.2.1.7.1	Intraartikuläre Injektion von Steroiden oder Hyaluronsäureanaloga	22
1.2.1.7.2	Intraartikuläre Injektion von Wachstumsfaktoren	23

<u>1.2.2</u>	<u>Transplantationen</u>	23
1.2.2.1	Autogene Transplantate	24
1.2.2.2	Knorpel-Knochen-Allografts	26
1.2.2.3	Periost und Perichondriumtransplantationen	26
1.2.2.4	Autologe Chondrozytentransplantation	27
<b>1.3</b>	<b>Tissue Engineering</b>	28
<b>1.4</b>	<b>Substitutionsmethoden</b>	29
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	30
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methode</u></b>	31
<b>2.1</b>	<b>Versuchsgruppen</b>	31
<u>2.1.1</u>	<u>Gruppe 1 :</u> Heilungsverhalten von nativem Knorpel	31
<u>2.1.2</u>	<u>Gruppe 2:</u> Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel	31
<u>2.1.3</u>	<u>Gruppe 3:</u> Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel in Kombination mit nativem Knorpel	32
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Versuchsreihen</b>	32
<u>2.2.1</u>	<u>Knorpelgewinnung</u>	32
2.2.1.1	Narkotisierung	32
2.2.1.2	Entnahmetechnik	33
2.2.1.2.1	Materialien	33
2.2.1.3	Chondrozytenisolierung	35
2.2.1.3.1	Materialien	36
2.2.1.4	Zellkultur	38
2.2.1.4.1	Materialien	39
2.2.1.5	Einbettung der Chondrozyten in Alginat	40
2.2.1.5.1	Materialien	41
2.2.1.6	Herstellung der Pellets	43

2.2.1.6.1	Materialien	44
<u>2.2.2</u>	<u>Versuchsdurchführung</u>	46
2.2.2.1	Gruppe 1: Naht von nativem mit nativem Knorpel	46
2.2.2.2	Gruppe 2: Naht von gezüchtetem Knorpel (Pellet)	46
2.2.2.3	Gruppe 3: Naht von Pellet mit nativem Knorpel	47
<b>2.3</b>	<b>Auswertungsverfahren</b>	48
<u>2.3.1</u>	<u>Material der Auswertungsverfahren</u>	48
2.3.1.1	Instrumente	48
2.3.1.2	Verbrauchsmaterial	49
2.3.1.3	Chemikalien	49
2.3.1.4	Ansätze	50
<u>2.3.2</u>	<u>Methoden der Auswertungsverfahren</u>	51
2.3.2.1	Einbettung der Präparate in Paraffin	51
2.3.2.2	Färbung der Schnitte	52
2.3.2.2.1	Toluidin-Blau Färbung	52
2.3.2.2.2	HE-Färbung	52
2.3.2.3	Bearbeitung der Präparate zur Immunhistologie	54
2.3.2.4	Bearbeitung der Präparate zur Polarisation	55
2.3.2.5	Bearbeitung der Präparate zur Rasterelektronenmikroskopie	56
<b><u>3</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	58
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse Gruppe 1: Heilungsverhalten von nativem Knorpel</b>	59
<u>3.1.1</u>	<u>Toluidin-Blau-Färbung</u>	59
<u>3.1.2</u>	<u>HE-Färbung</u>	60
3.1.3	<u>Immunhistologie</u>	61
3.1.3.1	Kollagen-I-Nachweisverfahren	61
3.1.3.2	Kollagen-II-Nachweisverfahren	62
3.1.4	<u>Polarisation</u>	63
3.1.5	<u>Rasterelektronenmikroskopie</u>	64

<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse Gruppe 2: Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel</b>	<b>65</b>
3.2.1	<u>Toluidin-Blau-Färbung</u>	65
3.2.2	<u>HE-Färbung</u>	66
3.2.3	<u>Immunhistologie</u>	67
3.2.3.1	Kollagen-I-Nachweisverfahren	67
3.2.3.2	Kollagen-II-Nachweisverfahren	68
3.2.4	<u>Polarisation</u>	69
3.2.5	<u>Rasterelektronenmikroskopie</u>	70
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse Gruppe 3: Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel in Kombination mit nativem Knorpel</b>	<b>71</b>
3.3.1	<u>Toluidin-Blau-Färbung</u>	71
3.3.2	<u>HE-Färbung</u>	72
3.3.3	<u>Immunhistologie</u>	73
3.3.3.1	Kollagen-I-Nachweisverfahren	73
3.3.3.2	Kollagen-II-Nachweisverfahren	74
3.3.4	<u>Polarisation</u>	75
3.3.5	<u>Rasterelektronenmikroskopie</u>	76
<b><u>4</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>77</b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>88</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>89</b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b>107</b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>108</b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Erklärung</u></b>	<b>109</b>

## Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen:

1.	Tiefer Knorpeldefekt in der Belastungszone eines Kniegelenkes	2
2.	Chondrozyt 5000fach vergrößert	5
3.	Zusammensetzung der Proteoglykane im hyalinen Knorpel	6
4.	REM eines Proteoglykan-Aggregates	6
5.	Vorkommen von Kollagen I und II im Bereich des Kniegelenks	9
6.	Darstellung der vier Zonen des hyalinen Knorpels	9
7.	Histologie von elastischem Knorpel (HE-Färbung)	11
8.	Histologie von Faserknorpel (HE-Färbung)	12
9.	Chondrozyten in vitro Kultur 3 Tage nach Isolierung	38
10.	Chondrozyten in vitro Kultur 7 Tage nach Isolierung	38
11.	Schematische Darstellung der Herstellung von Pellets	43
12.	Pellet nach 14 Tagen geschnitten und genäht	46
13.	Toluidin-Blau-Färbung nativer Knorpel	59
14.	HE-Färbung nativer Knorpel	60
15.	Immunhistologie Kollagen I nativer Knorpel	61
16.	Immunhistologie Kollagen II nativer Knorpel	62
17.	Polarisation nativer Knorpel	63
18.	REM 20fach nativer Knorpel	64
19.	REM 50fach nativer Knorpel	64
20.	REM 200fach nativer Knorpel	64
21.	REM 500fach nativer Knorpel	64
22.	Toluidin-Blau-Färbung in vitro Knorpel	65
23.	HE-Färbung in vitro Knorpel	66
24.	Immunhistologie Kollagen I in vitro Knorpel	67
25.	Immunhistologie Kollagen II in vitro Knorpel	68
26.	Polarisation in vitro Knorpel	69
27.	REM 20fach in vitro Knorpel	70
28.	REM 50fach in vitro Knorpel	70
29.	REM 200fach in vitro Knorpel	70
30.	REM 500fach in vitro Knorpel	70

31.	Toluidin-Blau-Färbung nativer/ in vitro Knorpel	71
32.	HE-Färbung nativer/ in vitro Knorpel	72
33.	Immunhistologie Kollagen I nativer/ in vitro Knorpel	73
34.	Immunhistologie Kollagen II nativer/ Knorpel	74
35.	Polarisation nativer/ in vitro Knorpel	75
36.	REM 50fach nativer/ in vitro Knorpel	76
37.	REM 200fach nativer/ in vitro Knorpel	76
38.	REM 200fach nativer/ in vitro Knorpel	76
39.	REM 500fach nativer/ in vitro Knorpel	76

Tabellen:

1.	Verdauungszeiten zum Abbau der extrazellulären Matrix	35
2.	Alkoholreihe im Autotechnikon	51
3.	Absteigende Alkoholreihe	53
4.	Aufsteigende Alkoholreihe	53

## 1 Einleitung

Schon 1743 manifestierte Hunter [HUNTER, 1743]: „If we consult the standart Chirurgical Writers from Hippocrates down to the present Age, we shall find, that an ulcerated Cartilage is universally allowed to be a very troublesome Disease; that it admits of a cure with more Difficulty than a carious Bone; and that, when destroyed, it is never recovered“. Frei übersetzt bedeutet dies, daß man bereits seit Hippokrates um die Schwierigkeiten eines ulzerierten bzw. geschädigten Knorpels weiß und es somit damals schon bekannt war, daß ein verletzter Knorpel nie wieder heilt.

Diese Aussage gilt nun seit mehr als zweieinhalb Jahrhunderten und zog eine Vielzahl von wissenschaftlichen Untersuchungen nach sich, die diese frühe Erkenntnis nur bestätigten konnten.

Noch heute gilt, daß verletzter Knorpel in Gelenken keine Tendenz zur hyalinen Reparatur zeigt. Selbst kleine Fissuren oder oberflächliche Knorpelläsionen glätten sich in Gelenken nur, heilen jedoch nicht [PAP, 1961; CALANDRUCCIO, 1962; FURUKAWA, 1980; HANGODY, 1997; NEWMAN, 1998; GRANDE, 1999; HUNZIKER, 1999; CHEN, 1999]. Tiefere Läsionen, welche bis in den durchbluteten subchondralen Knochen reichen, werden lediglich mit dem für Gelenke biomechanisch und biochemisch minderwertigen Faserknorpel gefüllt [CONVERY, 1972; MEENEN, 1993; BRITTBERG, 1994; BUCKWALTER, 1999; GHIVIZZANI, 2000; TEMENOFF, 2000]. Dieses Reparaturgewebe kann aufgrund der veränderten biomechanischen Eigenschaften die bei Belastung der Gelenkfläche auftretenden Kräfte nicht ausreichend abfangen bzw. auf effiziente Art weiterleiten, so daß eine Destruktion mit Arthrosebildung folgt [MANKIN, 1974]. Knorpel hat als Gewebe mit rein mechanischen Aufgaben der Dämpfung und des Gleitens von Gelenken eine hohe Sensibilität gegenüber mechanischen Läsionen.

Die Zahl der Schäden nimmt aufgrund der hohen sportlichen Aktivität der Bevölkerung stetig zu, wobei besonders kniebelastende Sportarten, wie zum Beispiel Snowboarding, Inline-Skating und Langstreckenläufe zuletzt an Attraktivität gewonnen haben [SPINDLER, 1993; SCHIEBER, 1994; HILGERT, 1996; DE LOES, 2000; WEISE, 2000]. Damit wird auch die Altersstruktur der von Knorpelschäden betroffenen Personengruppen deutlich. Es handelt sich

überwiegend um junge, aktive, im Arbeitsprozeß stehende Menschen, für die bei Verletzung des Knorpels vor allem im Bereich des Kniegelenkes ein langer Leidensweg beginnt [MINK, 1989; VELLETT, 1991; BUCKWALTER, 1997].

Das Ziel von Therapieansätzen für junge, aktive Patienten mit geschädigtem Gelenkknorpel ist es, die Integrität der Gelenkoberfläche wiederherzustellen und dem Patienten eine uneingeschränkte private und berufliche Lebensführung zu ermöglichen [SAXON, 1999].

Nach zunächst konservativer Behandlung werden operative Therapieversuche unternommen, die jedoch fast ausschließlich eine Faserknorpelregeneration erreichen [METSARANTA, 1996]. Faserknorpel ist aber strukturell nicht in der Lage, die an den Gelenkknorpel gestellten mechanischen Anforderungen zu erfüllen [HUNTER, 1995].

Dies bedeutet, daß selbst mit aufwendigen Transplantationsverfahren, zuletzt mit der Knorpelzelltransplantation, nur Teilerfolge erzielt werden können, die zwar zu einer zeitlich begrenzten Beschwerdenminderung führen, aber die Entwicklung einer Arthrose nicht definitiv verhindern können [MEENEN, 1998].

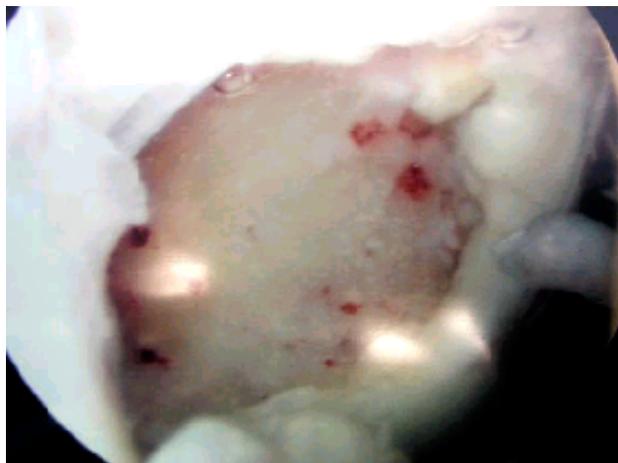


Abb. 1: Arthroskopisches Bild eines bis an die subchondrale Lamelle reichenden, großen Knorpeldefektes in der Hauptbelastungszone der medialen Condyle eines Kniegelenkes bei einem 45-jährigen Patienten.

So sind die Folgen einer Gelenkknorpelverletzung schwerwiegend und enden oft nach jahrelanger Schmerzsymptomatik sowie beruflichen und privaten Einschränkungen in einer ausgeprägten Arthrose mit Bewegungs- und Belastungseinschränkungen, Gelenkblockierungen sowie Ergußbildung [MANKIN, 1982]. Daraus resultiert letztendlich ein operativer Gelenkersatz

mittels Arthrodesese oder Prothesenimplantation. Dies ist jedoch, vor allem beim jungen Menschen, aufgrund der limitierten Funktionalität und Lebensdauer der Implantate kein adäquater Therapieansatz [RAND, 1991; TWYMAN, 1991].

Es gilt also eine Methode zu entwickeln, die in der Lage ist den verletzten Knorpel regenerieren zu lassen, um das Gelenk in dessen Funktionalität zu erhalten. Die Therapieergebnisse der bislang entwickelten und verwendeten Verfahren bei traumatischen oder degenerativ bedingten Knorpelschäden sind bis heute noch unbefriedigend [TEMENOFF, 2000; ERGGELET, 2001], da die meisten dieser Methoden zwar den Untergang des Knorpels verzögern, jedoch nicht verhindern können. Diese herkömmlichen Verfahren werden auf den folgenden Seiten beschrieben. Zunächst wird jedoch zum besseren Verständnis auf den allgemeinen Knorpelaufbau eingegangen.

## **1.1 Knorpel**

### 1.1.1 Allgemeiner Knorpelaufbau

Knorpel ist ein Stützgewebe. Es entsteht aus mesenchymalen Zellen, welche die Knorpelgrundsubstanz, die Glycosaminoglycane sowie die Proteoglykane [LEONHARDT 1990] bilden.

Als einziger Zelltyp im Knorpel kommen die Chondrozyten vor, sie machen etwa 1% des Knorpelvolumens aus, so daß man bei Knorpel von einem zellarmen Gewebe sprechen kann. Zum Beispiel findet man im humanen Femurkopfkorpel nur ca. 10 000 Zellen pro mm<sup>2</sup> [ERGGELET, 2001]. In den Knorpelzellen erfolgt die Synthese der Kollagenvorstufen bis hin zum Prokollagen [BUCKWALTER, 1997].

Der größte Teil des Knorpels wird von der extrazellulären Matrix eingenommen, die zu 60-80% aus Wasser besteht [MANKIN, 1978] und große Proteoglykan-Hyaluronsäure-Aggregate enthält.

Im Knorpel befinden sich keine Nerven sowie keine Blut- und Lymphgefäße. Während junger Knorpel in den tieferen Zonen seine Nährstoffe auch aus den Markgefäßen des darunterliegenden Knochens erhalten kann, ist der ausgereifte Gelenkknorpel nach Ausbildung der Verkalkungszone von diesen

abgeschnitten. Der erforderliche Stoffaustausch zur Ernährung des reifen Knorpels erfolgt dann per diffusionem und wird durch eine Wechseldruckbe- und -entlastung des Knorpels gefördert (Pump-Saug-Mechanismus) [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994; BUCKWALTER, 1997]. Dabei bildet die wasserreiche Grundsubstanz zusammen mit der Synovialflüssigkeit ein in sich geschlossenes System, das einerseits Stöße abdämpft und andererseits die Ernährung der Chondrozyten im gefäßfreien Knorpel sicherstellt [BELLO, 1997].

Im Gelenkknorpel überwiegen anaerob ablaufende Stoffwechselprozesse, so können Knorpelzellen auch noch unter sehr geringen Sauerstoffbedingungen (bis 1% Sauerstoffpartialdruck) ihre regelhafte Funktion aufrechterhalten [ERGGELET, 2001].

Man kennt drei Knorpelarten: den elastischen Knorpel, den Faserknorpel sowie den hyalinen Knorpel. Sie unterscheiden sich durch die Ansammlung von verschiedenen Kollagentypen, durch Differenzen im Aufbau der extrazellulären Matrix sowie durch das Verhältnis von Zellen zu Interzellulärsbstanz und von Kollagen zu Glycosaminoglycanen. Dadurch weisen sie unterschiedliche Eigenschaften auf, die aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation von Bedeutung sind [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994].

#### 1.1.1.1 Chondrozyten

Die Bildung des Knorpels beginnt mit der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Knorpelvorläuferzellen, den Chondroblasten [VON DER MARK, 1979]. In den folgenden Mitosen entstehen Ansammlungen dicht gepackter Chondroblasten. Diese beginnen schließlich mit der Synthese von Grundsubstanz und extrazellulären Fasern, welche sezerniert werden [AYDELOTTE, 1992].

Dadurch wird jeder Chondroblast in eine Art Hohlraum (Lakune) der Knorpelmatrix eingeschlossen und somit von den anderen Chondroblasten getrennt. Der Zell-Zell-Kontakt geht hierdurch verloren [BUCKWALTER, 1997].

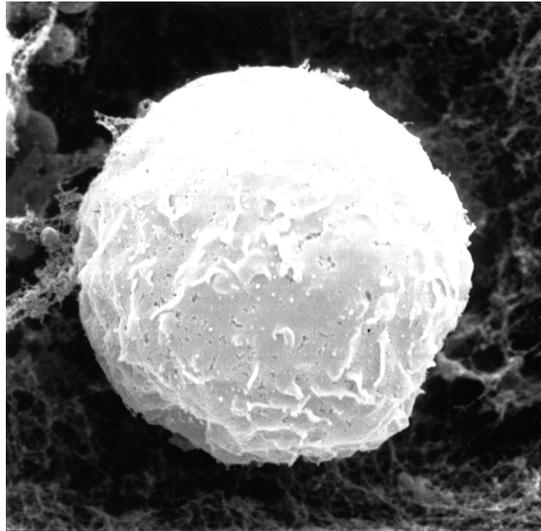


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Chondrozyten. 5000fach vergrößert.

Es folgen eine oder zwei weitere Mitosen, wodurch eine kleine Gruppe reifer Zellen, getrennt durch wenig Zwischenzellsubstanz, entsteht. Die reifen Chondrozyten sorgen für die Erhaltung der Zellmatrix. Im Zentrum des wachsenden Knorpels sind bei den Chondrozyten, im Gegensatz zu denen im Bereich der Peripherie, Differenzierung und Reifung am weitesten fortgeschritten [BUCKWALTER, 1995].

Am Ende der Reifung besteht der Knorpel aus Chondrozyten, die in viel Knorpelgrundsubstanz eingebettet sind [BUCKWALTER, 1997].

In den Chondrozyten findet man die zur Matrixsynthese wichtigen Organellen einschließlich des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi Apparates, in ihnen erfolgt die Synthese der Kollagenvorstufen bis hin zum Prokollagen, der großen Proteoglykan-Aggregate sowie spezifischer nicht-kollagener Proteine [PALFREY, 1966; VON DER MARK, 1979; BUCKWALTER, 1997].

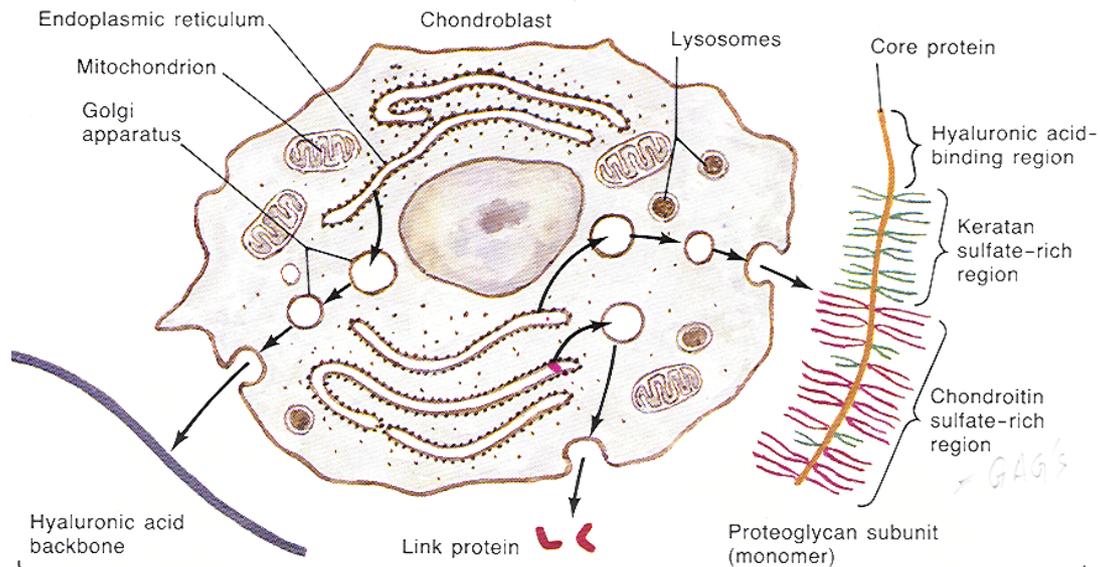
Nach Sekretion der Prokollagenmoleküle erfolgt extrazellulär die Aggregation und Vernetzung zu Tropokollagen, den kollagenen Fibrillen und schließlich den bis zu 0,5 µm dicken kollagenen Fasern [FARMER, 1989].

#### 1.1.1.2. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels besteht aus zwei Komponenten: die Gewebeflüssigkeit, die bei hyalinem Knorpel etwa 60-80% ausmacht

[MANKIN, 1978] und die strukturgebenden Makromoleküle [BUCKWALTER, 1997]. Diese teilen sich in Proteoglykane sowie in Kollagenfasern auf. Erstere stellen sich als große Proteoglykan–Hylaruronsäure–Aggregate dar, welche zu 95% aus den Glycosaminoglycanen Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat sowie zu 5% aus Proteinen (Core- und Link-Proteine) bestehen [HARDINGHAM, 1992].

### Formation and Composition of Proteoglycan



**Abb. 3:** Zusammensetzung und Aufbau der Proteoglykane des hyalinen Knorpels.

aus: The CIBA Collection Of Medical Illustrations Vol 8 Musculoskeletal System Part I Anatomie, Physiology and Metabolic Disorders. Frank H. Netter, M.D. Ciba-Geigy Corp., Summit, New Jersey, Jul 1987, Seite 173



**Abb. 4:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Proteoglykan-Aggregates.

aus: The CIBA Collection Of Medical Illustrations Vol 8 Musculoskeletal System Part I Anatomie, Physiology and Metabolic Disorders. Frank H. Netter, M.D. Ciba-Geigy Corp., Summit, New Jersey, Jul 1987, Seite 175

Aufgrund ihrer sehr starken Wasserbindungsfähigkeit (Hydratation) sind die Proteoglykan-Aggregate für den hohen Gewebsturgor und somit für die Permeabilität und Elastizität des Knorpels verantwortlich [MOW, 1988].

Diese Moleküle können bis auf 20% ihres Volumens zusammen gepreßt werden und sorgen damit bei anfallenden Bewegungen des Körpers, die ständig mit einem Wechsel von Druck und Entspannung einhergehen, für eine durchgehende Flüssigkeitsbewegung. [NEWMANN, 1998; ERGGELET, 2001; BUCKWALTER, 1994]. Desweiteren können sie sich an Kollagenfasern binden und mit diesen interagieren. Das Netzwerk dieser Kollagenfasern gibt dem Gewebe seine Form und seine Widerstandskraft [BUCKWALTER, 1997]. Im gesunden und ausgereiften Gelenkknorpel trifft man dabei am häufigsten, nämlich in 90-95%, auf Kollagen Typ II. Man findet jedoch auch Typ VI, IX, X, und XI [EYRE, 1995]. In der Zellkultur oder bei pathologischen Veränderungen werden noch andere Kollagentypen, vor allem Typ I und III, wie beim Faserknorpel, synthetisiert. Bei hypertrophem Knorpel findet man vor allem Kollagen Typ X. Kollagen II- und XI-Moleküle werden versetzt aneinandergelagert und bewirken so die periodische Querstreifung der kollagenen Fasern. [GRUNDMANN, 1986; WHEATER, 1987].

Alle Kollagenmoleküle bestehen aus drei Polypeptid- $\alpha$ -Ketten, die wie bei einem gedrehten Seil umeinander gewickelt sind. Diese Ketten unterscheiden sich in ihrer Anordnung der Aminosäuren. Je nach Kombination dieser verschiedenen  $\alpha$ -Ketten entstehen die differenten Kollagentypen [NETTER, 1987].

#### 1.1.1.3 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel ist der am häufigsten vorkommende Knorpeltyp. Intakter hyaliner Knorpel ist bläulich weiß durchscheinend. Er kommt in den meisten Gelenkflächen vor. Man findet ihn jedoch auch in der Nasenscheidewand, dem Kehlkopf, den Luftröhrenringen und den sternalen Enden der Rippen. Im Bereich von Gelenken überzieht der Knorpel als wenige Millimeter dicke Schicht die Oberfläche der angrenzenden Knochen [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994].

#### 1.1.1.3.1 Makroskopischer Aufbau

Die Chondrozyten sind zusammen mit Glycogengranula in der reichlich entwickelten Interzellulärsubstanz eingelagert. Diese sehr druckelastische Substanz besteht aus Fibrillen, welche durch ein Netzwerk von Kollagenfasern und Proteoglykan-Aggregate entstehen [NETTER, 1987]. Die Fibrillen weisen das gleiche Lichtbrechungsvermögen wie das sie umhüllende Material auf und werden somit maskiert. Die Interzellulärsubstanz hinterläßt somit einen optisch homogenen Eindruck [WHEATER, 1987]. Dies gilt allerdings nicht für gealterten hyalinen Knorpel [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994].

#### 1.1.1.3.2 Biomechanik des Knorpels

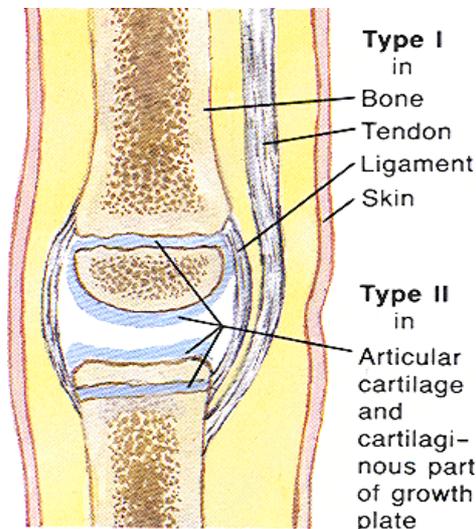
Die Hauptaufgabe des Gelenkknorpels besteht aus einer effizienten Übertragung von mechanischer Kraft über bzw. durch das Gelenk hindurch. Jegliche minimale strukturelle Veränderung innerhalb des Knorpels hat Einfluß auf die Effektivität dieser Kraftübertragung [NIMNI, 1988].

Die physikalischen Eigenschaften des Gelenkknorpels, nämlich hohe Druckfestigkeit in Verbindung mit geringer Zugfestigkeit [CAMPBELL, 1969; ERGGELET, 2001], läßt sich durch die Anordnung der Kollagenfasern in den vier unterschiedlichen Zonen des Knorpels erklären. Bei senkrechtem Druck auf das Gelenk wird dieser durch die tangentielle Anordnung der Kollagenfasern in der oberflächlichen Zone aufgefangen, z.T. nach außen abgeleitet und nur in effizientem Maß an die unteren Schichten des Knorpels weitergegeben. Diese Tangentialfasern führen hierbei zu einer Stabilisierung des Knorpels [HASLER, 1999]. Bei lateralem Zug jedoch drohen die Faserverbunde bzw. die Fibrillen der oberflächlichen Schicht, da sie nur locker aneinander gebunden sind, auseinanderzureißen [NIMNI, 1988].

#### 1.1.1.3.3 Mikroskopischer Aufbau

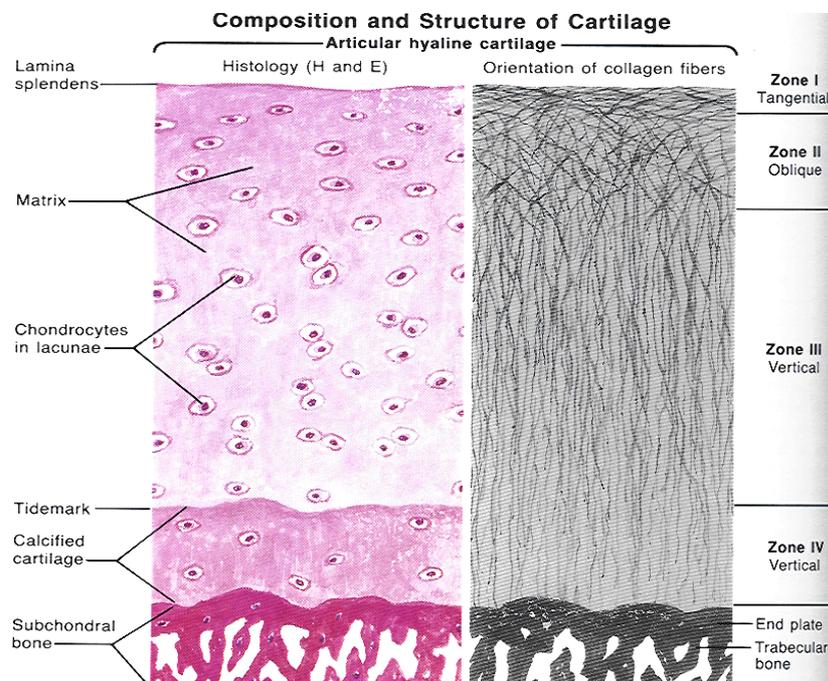
Der Gelenkknorpel besteht aus einem Verbund von Knorpelzellen und einer Interzellulärsubstanz mit hochvisköser Konsistenz [BUCKWALTER, 1997]. Die Ausbildung fädiger Makromoleküle in netz- oder bündelartigen Verbänden

bewirkt eine Verfestigung und Verstärkung [MOW, 1984]. Der reife hyaline Knorpel ist durch Ansammlungen von Chondrozyten, die in eine amorphe Matrix aus Grundsubstanz und kollagenen Fasern gebettet ist, ausgezeichnet. Das Kollagen Typ II ist der wichtigste Faserbestandteil des hyalinen Knorpels.



**Abb. 5:** Vorkommen von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II im Bereich des Kniegelenks.

aus: The CIBA Collection Of Medical Illustrations Vol 8 Musculoskeletal System Part I Anatomie, Physiology and Metabolic Disorders. Frank H. Netter, M.D. Ciba-Geigy Corp., Summit, New Jersey, Jul 1987, Seite 168



**Abb. 6:** Darstellung der vier Zonen im Bereich des hyalinen Knorpels mit Übersicht bezüglich der Anordnung der Kollagenfasern.

aus: The CIBA Collection Of Medical Illustrations Vol 8 Musculoskeletal System Part I Anatomie, Physiology and Metabolic Disorders. Frank H. Netter, M.D. Ciba-Geigy Corp., Summit, New Jersey, Jul 1987, Seite 168

Die morphologischen Unterschiede der Chondrozyten sowie der extrazellulären Matrix von der Gelenkoberfläche bis zur subchondralen Zone lassen vier verschiedene Lagen oder Zonen identifizieren. Diese bestehen aus einer Gleit- oder Tangentialfaserzone, einer Übergangszone, einer Radiärzone sowie einer Mineralisierungszone [BUCKWALTER,1988]. Obwohl jede dieser Zone unterschiedliche morphologische Charakteristika aufweist, kann man die Grenzen zwischen den verschiedenen Lagen nicht genau abgrenzen.

Die Tangentialfaserzone ist ca. 100 µm dick, die Chondrozyten sind fibroblasten-ähnlich und parallel zum Kollagenfasengerüst angeordnet. In der Übergangszone findet man eine unregelmäßige Anordnung der Knorpelzellen im sich überschneidenden Kollagenfasengerüst. In der Radiärzone, welche die dickste Zone ist, sind die Zellen sowie die Kollagenfasern senkrecht zur Gelenkoberfläche angeordnet. Die Mineralisierungszone schließlich ist durch die zunehmende Verknöcherung und durch degenerative Veränderungen der Chondrozyten charakterisiert [ERGGELET, 2001].

Die extrazelluläre Matrix der Zonen unterscheidet sich in der Anordnung von Knorpelzellen zu Kollagenfasern sowie in der Größe der Aggregate [BUCKWALTER, 1990]. Zusätzlich variieren die Chondrozyten der vier Zonen in Form, Größe, Orientierung zur Gelenkoberfläche und auch in ihrer metabolischen Aktivität [MARLES, 1991; AYDELOTTE,1992].

#### 1.1.1.4 Elastischer Knorpel

Elastischer Knorpel kommt im äußeren Ohr sowie im äußeren Gehörgang, im Kehldeckel, in Teilen des Kehlkopfknorpels und an den Wänden der Ohrtrumpete vor.

Er ist verglichen mit hyalinem Knorpel gegenüber degenerative Veränderungen weitaus weniger empfindlich. Im Alter weist der elastische Knorpel weder eine Asbestfaserung noch eine Kalkablagerung auf und verknöchert nicht [WHEATER, 1987]. Erklärt werden kann dies unter anderem durch die Tatsache, daß elastischer Knorpel, aufgrund seiner Lokalisationen, weitaus weniger belastet wird, als hyaliner Knorpel.

Der histologische Bau des elastischen Knorpels ähnelt dem des hyalinen Knorpels, nur daß der elastische Knorpel zusätzlich elastische Fasernetze

(Netzknorpel) enthält, die um die Chondrone laufen und die interterritoriale Substanz durchqueren sowie in das Perichondrium einstrahlen [ANDERSON,1964]. Dadurch gewinnt er seine ausgeprägte Elastizität und erhält durch die elastischen Fasern ein gelbliches Aussehen. Die Chondrone sind im Vergleich zum hyalinen Knorpel kleiner und zellärmer [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994].

Der elastische Knorpel hat die Funktion der Verformbarkeit und der Lagebeständigkeit.

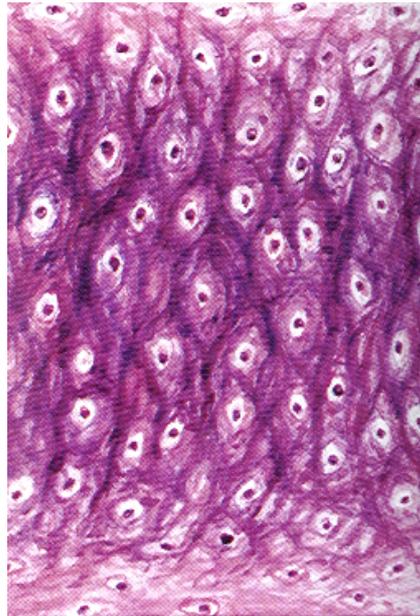


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme von elastischem Knorpel mit deutlicher Anfärbung der, um die Lakunen angeordneten, dunkler erscheinenden, elastischen Fasern (HE).

aus: The CIBA Collection Of Medical Illustrations Vol 8 Musculoskeletal System Part I Anatomie, Physiology and Metabolic Disorders. Frank H. Netter, M.D. Ciba-Geigy Corp., Summit, New Jersey, Jul 1987, Seite 168

#### 1.1.1.5 Faserknorpel

Der Faserknorpel weist sowohl Eigenschaften des hyalinen Knorpels wie auch des straffen Bindegewebes auf. Er kommt überwiegend in den Zwischenwirbelscheiben, Gelenkklippen und –disken (-menisken), in der Schambeinfuge und der Brustbeinsymphyse vor. In Verbindung mit straffem Bindegewebe findet man ihn in Gelenkkapseln, Bändern und manchen Sehnenansätzen am Knochen [HALL-CRAGGS,1990]. Außerdem entsteht nach Verletzung von hyalinem Knorpel in Folge der Regeneration zumeist Faserknorpel [BUCKWALTER, 1988; CHEN, 1992].

Diese Knorpelart besteht aus abwechselnden Lagen von hyaliner Knorpelmatrix mit Chondrozyten und von straffem Bindegewebe, dessen Fasern Richtung der funktionellen Belastung angeordnet ist. Die Chondrozyten liegen gewöhnlich in Reihen zwischen den straffen Kollagenfasern in den Lakunen der Glykoproteidmatrix. Die Kollagenfasern des Faserknorpels sind in der Regel kräftig und gehören zu den Typen I und III. [WHEATER, 1987]  
Durch die Ausprägung der Kollagenfasern ist der Faserknorpel stoß- und zugfest [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994].

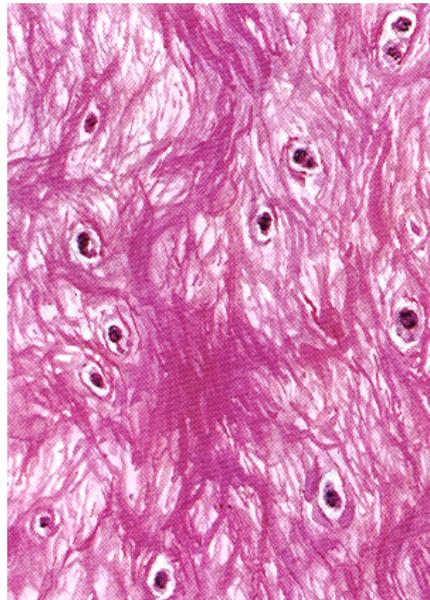


Abb. 8: Mikroskopische Aufnahme von Faserknorpel. Hier wird die unstrukturiert wirkende Anordnung der Fasern, verglichen mit hyalinem und elastischem Knorpel deutlich (HE).

aus: The CIBA Collection Of Medical Illustrations Vol 8 Musculoskeletal System Part I Anatomie, Physiology and Metabolic Disorders. Frank H. Netter, M.D. Ciba-Geigy Corp., Summit, New Jersey, Jul 1987, Seite 168

### 1.1.2 Allgemeine Knorpelheilung in vivo

Die klassische Reaktion des Körpers auf eine Verletzung vollzieht sich nach vergleichbaren Mechanismen. Obwohl man in unterschiedlichen Geweben und Organen charakteristische Abweichungen erkennen kann, findet man ein generelles Muster mit zwei immer wiederkehrenden Prozessen. Dies ist zum einen die Anwesenheit von spezifischen Zellen, die nicht nur das nekrotische Material abbauen, sondern auch die Synthese neuen Gewebes bewirken. Diese Zellen stammen entweder aus sessilen Zellen oder aus eingewanderten Zellen vom Wundrand bzw. aus der Blutversorgung [SILVER, 1991].

Zum anderen besteht bei der Heilung von Gewebe die Notwendigkeit einer Gefäßversorgung. So sprossen während der Heilungsphase Gefäße in das verletzte Gewebe ein. Dieses „neue“ Gefäßsystem versorgt die Zellen und ist zusätzlich der Lieferant vieler bioaktiver Moleküle, wie z.B. von Wachstumsfaktoren, chemotaktischen Faktoren, Zytokinen und anderen, die zur Herstellung eines adäquaten Umfeldes zur Heilung benötigt werden [SILVER, 1994].

Die Antwort auf eine Verletzung kann in drei Phasen gegliedert werden [MANKIN, 1982]:

Zum Zeitpunkt der Verletzung beginnt die erste Phase in Form der Nekrose. Die Zahl der absterbenden Zellen und damit die Größe der Nekrose ist abhängig von dem Ausmaß des Traumas. Da in dieser Phase natürlich auch Blutgefäße zerreißen, gelangt schon hier eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in das geschädigte Areal. Diese initiieren die Einwanderung pluripotenter Stammzellen in den verletzten Bereich und stimulieren eine Gefäßeinsprossung.

Die nächste Phase ist die der Entzündung. Diese ist fast ausschließlich abhängig von der Vaskularisation. Vasodilatation und -Permeabilität erlauben das Eindringen von Flüssigkeit und Proteinen, so wie die zelluläre Exsudation in die verletzte Region. Das Ergebnis ist ein Netzwerk aus Fibrinfasern, welches sowohl Entzündungszellen als auch pluripotente Zellen enthält, die die Fähigkeit haben sich zu Zellen zu differenzieren, welche das verletzte Gewebe reparieren können.

Als letzte und längste Phase des Heilungsprozesses wird die der Reparation gesehen. Sie beginnt, wenn in das fibrinöse Netzwerk Gefäßknospen einsprossen und somit ein gefäßreiches Granulationsgewebe bilden. In manchen Organen reift dieses Gewebe und zieht sich zu einer Narbe zusammen, in anderen durchwandern die Zellen ein Metaplasie und werden zu Zellen, die die Funktion und Struktur des Originalgewebes übernehmen.

Diese beschriebene klassische Reaktion des Gewebes auf ein Trauma findet im Knorpelgewebe nicht statt. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die fehlende Gefäßversorgung des Knorpelgewebes [MANKIN, 1974; MANKIN, 1982; SILVER, 1991]. Da die zweite und dritte Phase der Heilung größtenteils durch

das Gefäßsystem bestimmt werden, kann man diese klassischen entzündlichen und reparativen Prozesse im Knorpelgewebe nicht finden. Wenn jedoch die Verletzung des Knorpels bis in den subchondralen Knochen reicht und somit das Gefäßsystems des Knochens aktiviert wird, findet man zumindest in den unteren Anteilen des Knorpels annähernd die beschriebene klassische Reaktion auf ein Trauma.

Der zweite Unterschied zur klassischen Heilung ist, dass die Chondrozyten sprichwörtlich in einem Netz aus Proteoglykanen und Kollagenfasern gefangen werden und somit nicht in der Lage sind, zu der verletzten Region bzw. in das geschädigte Areal einzuwandern [DEPALMA, 1966; MANKIN, 1967; CAMPBELL, 1969; FULLER, 1972; NEWMANN, 1998].

In den folgenden Abschnitten wird nun auf die Knorpelheilung nach unterschiedlich starken Traumata eingegangen.

#### 1.1.2.1 Knorpelheilung nach Mikrotraumatisierung

Nach geringem Trauma des Gelenkknorpels kommt es primär zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix durch chondrozytäre Chondrolyse. Einher geht dies mit einem Verlust von Proteoglykanen und Kollagen Typ II und dem Auftreten von anderen Kollagen-Typen (I, III, und X). Es entsteht ein biomechanisch minderwertiger Faserknorpel, der an der langfristigen Degeneration des Knorpels beteiligt ist [MEACHIM, 1963; CAMPBELL, 1969; THOMPSON, 1975; CHEN, 1991].

#### 1.1.2.2 Knorpelheilung nach oberflächlicher Läsion

Bei einer oberflächlicher Verletzung des Gelenkknorpels kommt es primär zu einer Nekrose der betroffenen Knorpelzellen. Die umgebenden Chondrozyten reagieren darauf mit einem kurzfristigen Anstieg ihrer metabolischen und mitotischen Aktivität, verbunden mit einem Auftreten von Chondrozytenhaufen, sogenannten „Clustern“, die z.B. auch bei der Arthrose gesehen werden [GHADIALLY, 1977; BUCKWALTER, 1988; BUCKWALTER, 1997 II]. Dadurch

kommt es zu einer vermehrten Produktion und Ablagerung von Proteoglykanen sowie Kollagen Typ II in der extrazellulären Matrix.

Obwohl zunächst eine teilweise Defektheilung in Form eines minderwertigen Faserknorpels erfolgt, führen übermäßige Proliferation und fehlende Migration der Chondrozyten langfristig zu einer vorzeitigen Degeneration des Gewebes [GHADIALLY, 1977; MANKIN, 1982; BUCKWALTER, 1988; CHEN, 1992].

#### 1.1.2.3 Knorpelheilung nach osteochondralem Defekt

Wenn die Verletzung von Gelenkknorpel bis in die subchondrale Zone des Knochens reicht, wird der Heilungsprozeß durch die potentielle Aktivierung des knöchernen Gefäßsystems stimuliert. Der Defekt wird mit einem Fibrinpfropf, welcher Blut- und Knochenmarkszellen enthält, aufgefüllt [THOMPSON, 1975; BUCKWALTER, 1988]. Durch die zuvor beschriebene entzündliche und reparative Phase entsteht dann eine reifende zelluläre Masse. In den tieferen Zonen formiert sich der Knochen und rekonstruiert die subchondrale Platte. Das reparative Gewebe in dem Knorpeldefekt durchwandert eine Metaplasie zu Faserknorpel [KEY, 1931; VACHON, 1986; CONVERY, 1972, MITCHELL, 1976; SHAPIRO, 1993].

Etwa zwei Wochen später erscheinen rundliche Chondrozyten und produzieren Kollagen Typ II. Trotzdem findet sich immer noch ein großer Anteil an Kollagen Typ I (35%) [FURUKAWA, 1980; BUCKWALTER, 1988]. Der Proteoglykan-Gehalt sinkt signifikant und die tangentialen Kollagenschichten der oberflächlichen Zone werden nicht gebildet [MITCHELL, 1976].

Die Kollagenfibrillen des Reparaturgewebes verknüpfen sich nicht gut mit dem umliegenden Knorpel. In manchen histologischen Schnitten des Reparaturgewebes sowie des umgebenden Knorpels sahen viele Autoren die beiden Schichten durch Lücken getrennt [DESJARDINS, 1991; WAKITANI, 1994; BRITTBERG, 1996]. Dieser Zustand könnte zu Mikrobewegungen und degenerativen Veränderungen führen.

Zwischen dem 6 und 12 Monat nach Verletzung ähneln die extrazelluläre Matrix wie auch die Zellen immer mehr Faserknorpel. Je mehr Zeit vergeht, um so häufiger findet man in den ehemals verletzten Zonen Regionen ohne Zellen

mit Gewebsdegeneration [MEACHIM, 1971; COLETTI, 1972; HURTIG, 1988; CHEN, 1992; SHAPIRO, 1993].

Nachdem nun in den vorherigen Abschnitten auf die Knorpelheilung in vivo, vorwiegend im Hinblick auf die Chondrozyten, eingegangen wurde, soll nun im Folgenden das Augenmerk auf das Verhalten der Knorpelzellen in vitro gelenkt werden.

### 1.1.3 Verhalten von Chondrozyten in Kultur

Knorpelgewebe eignet sich gut für die Gewebezüchtung in vitro, da Gelenkknorpel lediglich aus einer Zellart, den Chondrozyten besteht und Gefäße sowie Nerven im Gelenkknorpel nicht angelegt sind. Auch die Ernährung der Knorpelzellen erfolgt in vivo ebenso per diffusionem [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994]. Dabei können Knorpelzellen sämtliche Matrixproteine in ausreichender Qualität und Menge produzieren [BRITTBURG, 2001].

Die Gewinnung des Knorpelgewebes erfolgt zunächst als Biopsieentnahme, z.B. im Rahmen einer Arthroskopie des Kniegelenkes. Hierbei werden dünne Schnitte der Tangentialfaserzone des Gelenkknorpels entnommen und darauf geachtet, daß vor allem die Mineralisierungszone nicht mit biopsiert wird [LEE, 1998]. Nach Isolierung der Chondrozyten durch enzymatischen Verdauung der extrazellulären Matrix, z.B. mittels Hyaluronidase und Kollagenase, werden die Zellen in eine Kulturflasche gegeben. Hier proliferieren die Zellen mit einem Verdopplungsintervall von 2-3 Tagen. Bei Konfluenz der Zellen werden diese trypsinisiert und auf mehrere Flaschen verteilt.

Es ist bekannt, daß Knorpelzellen in Monolayer-Zellkultur innerhalb kürzester Zeit deutliche morphologische Veränderungen, mit dem Auftreten von fibroblastenähnlichen Zellformen und dem Verlust der knorpelspezifischen Kollagentypen im Sinne einer Dedifferenzierung aufzeigen [BENYA, 1978; BENYA, 1982; LEMARE, 1998].

Zum Beispiel versuchte Carranza Knorpelzellen aus unterschiedlichen Geweben zu züchten. Bei Kaninchen wurden Zellen aus Periostlappen der Tibia und dem Rippenperichondrium entnommen. Hieraus wurde

Knorpelgewebe in einer Monolayerkultur gezüchtet. Das so gewonnen Gewebe bestand jedoch ausschließlich aus Faserknorpel mit den dafür typischen Kollagen Typen I und III [CARRANZA, 1999].

Dedifferenzierung bedeutet, daß anstelle des knorpelspezifischen Kollagens Typ II vermehrt Kollagen I produziert wird [BENYA, 1978; LEMARE, 1998]. Molekularbiologische Untersuchungen bestätigen eine deutliche Veränderung der Genexpression zwischen Chondrozyten und dedifferenzierten fibroblastenähnlichen Zellen [SCHNABEL, 2002]. Aus diesem Grund sollten die Chondrozyten nach Erreichen der notwendigen Zellzahl von der Zellkulturflasche gelöst und in eine dreidimensionale Anordnung zur Redifferenzierung gebracht werden [BENYA, 1982; AYDELOTTE, 1988; LEE, 1998; RAHFOTH, 1998]. Im engen Zell- Zellkontakt teilen sie sich nicht mehr, sondern beginnen mit der Produktion von für hyalinen Knorpel typischer extrazellulärer Matrix mit Glycosaminoglycanen und Kollagen II. Somit wird die Möglichkeit gegeben eine stabile und vor allem gewebetypische extrazelluläre Matrix aufzubauen, welche ein funktionstüchtiges Gewebekonstrukt garantiert [IDOWU, 2000].

Ein dafür sehr gut geeignetes System ist das Alginatsystem als 3-D-Kultursystem [SCHULZE, 2000].

Schulze konnte nachweisen, daß humane Chondrozyten während einer in-vitro Kultivierungsphase in Alginatkultur eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix produzieren, die in ihrem Aufbau der nativen Matrix ähnelt. Die Bildung dieser knorpelspezifischen extrazellulären Matrix mit Kollagen Typ II beginnt ca. 3-4 Tage nach Überführung in Alginat-Beads [SHAKIBAEI, 1997], eine ausreichende und knorpelspezifische Anhäufung von Kollagenen und Proteoglykanen läßt sich nach bereits sieben Tagen in der zellulären Matrix nachweisen [SCHULZE, 2000]. Es dauert jedoch ca. 14 Tage, um die Synthese von Kollagen I und III, Indikatoren für einen veränderten Phenotyp, vollständig zu unterdrücken [LEMARE, 1998]. So werden die Chondrozyten ab dem 14. Tag von einer zellassozierten Matrix umgeben, die eine biochemische Stabilität aufweist, sowohl im Hinblick auf eine Akkumulation von Kollagenen als auch von Proteoglykanen [MOK, 1994]. Wenn die Chondrozyten jedoch länger als zwei Monate in der Alginatkultur verbleiben, wird die Genexpression von Kollagen Typ II supprimiert [CHUBINSKAYA, 2001].

#### 1.1.4 Altersbedingte Veränderungen des Gelenkknorpels

Im Laufe des Lebens kann man im Bereich des Gelenkknorpels verschiedene Veränderungen beobachten. Diese können jedoch von Gelenk zu Gelenk erheblich in Form und Ausmaß variieren. [ARMSTRONG, 1982; HUDELMAIER, 2001]

Bereits ab dem 40. Lebensjahr findet man Chondrozyten, die durch übermäßige Ansammlungen von Glykogen im Zytoplasma und vermehrte Chromatinkondensationen in den Zellkernen an Zellvitalität verloren haben [O'DRISCOLL, 2000]. Durch das Absterben der Chondrozyten kommt es zu einer Verminderung des Zellvolumens, welches als erstes erkennbares Zeichen einer beginnenden Knorpeldegeneration gewertet wird. Die Druckelastizität läßt nach und gleichzeitig kann es zu einer Verminderung der Knorpelgrundsubstanz kommen. Es kommt stellenweise zur Demaskierung von Fasern (Asbestfaserung) und zur Höhlenbildung. Fleckige Kalkablagerungen treten auf [LEONHARDT, 1990; TITTEL, 1994].

Der in jungen Jahren bläulich-weiß anmutende Knorpel wird im Alter zunehmend gelblich, trübe und spröder. Zusätzlich zu dem Zellverlust kommt es jedoch noch zu einer Verschlechterung der Stoffwechsellage, dies kann man auf Veränderungen der Synovialflüssigkeit – ihr Proteingehalt sowie ihre Viskosität nehmen im Alter ab – und einen dadurch bedingten verminderten Substratnachschieb zurückführen. Diese Veränderung bewirkt eine mangelhafte Nachbildung von veränderten Proteoglykanen [MEACHIM, 1963; DEGROOT, 2000; VAN DE LEST; 2000].

Damit wird zwangsläufig die Elastizität des Knorpels und als Folge die Abpolsterung der Gelenke herabgesetzt, so daß letztendlich ein vermehrter Verlust an Knorpelsubstanz, welcher langfristig zu einer Arthrose führt, auftritt. [DEPALMA, 1966; ERGGELET, 2001]

## **1.2 Therapien von Knorpeldefekten**

Es gibt zahlreiche Therapieansätze von Knorpeldefekten. Ziel jeder Behandlungsmethode ist es die Funktion wiederherzustellen [MANKIN, 1974]. Leider ist allen gemeinsam, daß die vorliegenden Langzeitergebnisse keine funktionell gute Heilung der Knorpeldefekte bewirken.

Einige Therapieansätze wurden anfangs mit beeindruckenden Ergebnissen vorgestellt, hielten dann jedoch einer näheren Untersuchung im Verlauf nicht stand. Bis heute kann keine der zahlreichen Behandlungsansätze eine vollständige Heilung von Knorpeldefekten erreichen, daß heißt durch keine dieser Behandlungsmethoden kommt es zu der Wiederherstellung einer kongruenten Gelenkfläche mit hyalinem Knorpel [O'DRISCOLL, 1998].

Es gibt verschiedene Ansätze einen Knorpelschaden zu behandeln. Diese sind vor allem von dem Ausmaß des Defektes abhängig. Kleinere Defekte werden mit einem gewissem Erfolg durch die Pridie-Bohrung, die Abrasioplastik oder die Microfrakturierung behandelt. Diese Verfahren erreichen eine subchondrale Stimulation [AGLIETTI, 1994].

Bei größeren Läsionen hat sich zuletzt die Knorpel-Knochen-Transplantation etabliert.

Diffuse Arthrosen gesamter Gelenke erfordern unverändert den radikalen Oberflächenersatz durch Endoprothetik. Die Suche nach einem Verfahren zur mechanisch idealen und gewebetypischen Reparatur der Gelenkfläche bleibt für alle Knorpeldefekte ein zentrales Thema.

### 1.2.1 Konventionelle Therapien

#### 1.2.1.1 Gelenkspülung (Lavage)

Eine der ältesten und einfachsten Therapiemöglichkeiten stellt die Gelenk-Lavage dar. Jackson [JACKSON, 1988] beschreibt, daß durch das Spülen eines Gelenks die Entfernung von Entzündungsmediatoren und freien Knorpelstücken gelingt. So kann bei 80% der Patienten eine Besserung der Symptome erzielt werden, die bei 45% auch nach 3,5 Jahren noch anhält. 20% der Patienten profitieren jedoch nicht von dieser Methode [JACKSON, 1991].

Da die Lavage die Gelenkschädigung selbst nicht behebt, sondern nur zu einer vorübergehenden Beschwerdebesserung führen kann, stellt sie keine definitive Lösung, vor allem bei der Behandlung junger Patienten, dar. Sie kann jedoch dazu dienen, den Zeitpunkt für endoprothetische Maßnahmen hinauszuzögern [HADACKER, 1990; RAVAUD, 1999].

#### 1.2.1.2 Shaving

Zerstörter Gelenkknorpel kann zu mechanischen Problemen im Gelenk, bis hin zur vollständigen Kniegelenksblockade, führen. Dieses Phänomen ist auf frei bewegliche Knorpelpartikel oder ausgedehnte Fibrinablagerungen im Gelenk zurückzuführen. Darüber hinaus können Knorpelfragmente zu Synovitis und Gelenkergüssen führen [KIM, 1991].

Durch die vollständige Abtragung des verletzten wie instabilen Knorpels soll es zu einer Beseitigung der mechanischen Behinderung und durch Entfernung der Fibringerinnsel zu einer Verminderung der begleitenden Entzündungsreaktion kommen [BAUMGAERTNER, 1990; BUCKWALTER, 1994]. Magnusson [MAGNUSSON, 1941] berichtet 1941 mit dieser Methode bei 70% seiner Patienten gute bis exzellente Ergebnisse erzielt zu haben. Es mußte jedoch bei fast allen so therapierten Patienten etwa drei Wochen postoperativ eine Narkosemobilisation der behandelten Gelenke vorgenommen werden.

Mitchell und Kim konnten jedoch nach Durchführung eines Shavings keine Reparationsvorgänge in den behandelten Gelenken beobachten [MITCHELL, 1987; KIM, 1991]. Darüber hinaus legen Untersuchungen dar, daß es langfristig nach einem Shaving sogar zu einer gesteigerten Fibrinablagerung im betroffenen Gelenk kommt und der angrenzende gesunde Knorpel im Verlauf nekrotisch werden kann. Ähnlich wie bei der Lavage wird auch durch das Shaving die Symptomatik verbessert, die Gelenkschädigung jedoch nicht behoben [ALTMANN, 1992].

### 1.2.1.3 Osteotomien

Die Umstellungsosteotomie als kausale Therapie z.B. am Tibiakopf bewirkt eine Verringerung der mechanischen Belastung des überlasteten geschädigten Gelenkbereiches. Einige Untersucher fanden Hinweise dafür, daß der nun weniger belastete, geschädigte Knorpel teilweise regeneriert. Vorbehalten ist diese Methode für große Knorpeldefekte und klinisch relevante Achsfehler (varus/valgus).

### 1.2.1.4 Subchondrale Stimulation

Bei dieser Technik tritt durch punktuelle Perforation der subchondralen Lamelle Blut aus der Spongiosa in den Knorpeldefekt ein. Es kommt zu einem Einwachsen von Gefäßen in den Gerinnungspopf. Über diese Gefäße gelangen mesenchymale Stammzellen in den Defekt [VACHON, 1986; RAE, 1989]. Diese sind nun in der Lage sich zu Zellen der chondrogenen Reihe zu differenzieren und extrazelluläre Matrix zu produzieren. Allerdings wird bei diesem Verfahren, wie eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien zeigt, der Knorpeldefekt vorwiegend mit dem für Gelenkflächen minderwertigerem Faserknorpel ausgefüllt. Die so therapierten Patienten waren postoperativ zum größten Teil stark in ihrer alltäglichen Aktivität eingeschränkt [MEACHIM, 1971; MITCHELL, 1976; JOHNSON, 1991; KIM, 1991].

### 1.2.1.5 Pridie-Bohrung

Bei der Pridie-Bohrung, benannt nach dem Erstbeschreiber Pridie [PRIDIE, 1959], wird im Bereich des Knorpeldefektes bis in die subchondrale Spongiosa gebohrt. In den Untersuchungen von Tipett [TIPETT, 1991], der die Pridiebohrungen in Verbindung mit valgusierenden Umstellungsosteotomien der Tibia durchführte, wurde durch eine Nachuntersuchung über einen Zeitraum von 62 Monaten bei 70.8% der Patienten ein exzellentes Ergebnis, bei 15.4 % ein gutes und bei 6.9% ein befriedigendes bis schlechtes Resultat erzielt. Dies bestätigten auch andere Untersuchungen [MITCHELL, 1976; BRADLEY, 1989].

Bei Läsionen an unzugänglichen Arealen (z.B. Tibiaplateau und patellare Gelenkfläche) kann eine solche Bohrung auch retrograd durchgeführt werden.

#### 1.2.1.6 “Microfracture” –Technik

Bei dieser Methode werden mit Hilfe eines konischen und gekröpften Pfriems Löcher in die subchondrale Lamelle geschlagen. Dies führt zu Fissurlinien zwischen den Löchern und es resultiert im Gegensatz zur Pridie-Bohrung eine flächige Regenerationszone.

Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Bohrung ist, daß die Gefahr der Bildung von Hitzenekrosen des Knochens nicht besteht. Zudem können Microfractures auch im direkten Zugriff, im Bereich weniger zugänglicher Areale, durchgeführt werden.

In der größten, zur Evaluierung dieser Methode durchgeführten Nachuntersuchung berichtet Steadman et al. [STEADMAN, 1997; STEADMAN, 1999; STEADMAN, 2000] über mehr als 1200 Patienten in einem Nachuntersuchungszeitraum von 2 bis 8 Jahren. Die Patienten gaben auch nach 7 Jahren noch deutliche Verbesserungen bezüglich der Schmerzsymptomatik an. Steadman führt weiter an, daß das nach der Microfracture-Behandlung neugebildete Gewebe in histologischen Untersuchungen zum einen Teil aus hyalinem und zum anderen Teil aus Bindegewebsknorpel besteht. Postoperativ wird eine kontinuierliche Motorbewegungsschiene verordnet [RODRIGO, 1994].

#### 1.2.1.7 Injektion

##### 1.2.1.7.1 Intraartikuläre Injektion von Steroiden oder Hyaluronsäureanaloga

Injektionen von Steroiden konnten in den großen randomisierten und kontrollierten Studien keine längerfristige Verbesserung erzielen [SILBERBERG, 1966; OLAH, 1976; SHOEMAKER, 1992]. Auch die intraartikuläre Injektion verschiedener Hyaluronsäuren erbrachte, trotz einzelner positiver Beschreibungen, bisher keinen überzeugenden Erfolg im Sinne einer Stimulation der Knorpelzellen [MANKIN, 1966; SALTER, 1967; ADAMS, 1993]. Beide Konzepte müssen daher wegen ihrer möglichen

antiinflammatorischen und analgetischen Potenz als rein symptomatisch angesehen werden [BEHREND, 1976; IWATA, 1993].

#### 1.2.1.7.2 Intraartikuläre Injektion von Wachstumsfaktoren

Die intraartikuläre Injektion von Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- $\beta$ 1, IGF-I, BMP-2, auf die Wirkung der Knorpelstimulation sind auf der Basis zahlreicher in vitro-Studien untersucht worden [CUEVAS, 1988; ELFORD, 1992, DUNN, 1994; VAN BEUNINGEN, 1994; VAN DEN BERG, 1995].

Neidel [NEIDEL, 1992] fand heraus, daß intraartikuläre Gabe von IGF, FGF oder IGF keine Wirkung auf die Heilung von normalen Knorpeldefekten hat. Trotz der noch spärlich erhobenen Daten kann davon ausgegangen werden, daß die Bildung von osteophytären Anbauten in Zusammenhang mit der intraartikulären Gabe von TGF- $\beta$ 1 den Einsatz der Wachstumsfaktoren limitieren [ELFORD, 1992; VAN BEUNINGEN, 1993; HSIEH, 1997]. Für das effektive Einbringen von Wachstumsfaktoren oder anderen bioaktiven Wirkstoffen ist die lokale Implantation von Wachstumsfaktoren mit Hilfe eines Trägers in den Defekt der Gelenkoberfläche ein weitaus attraktiveres Konzept [HUNZIKER, 1996]. Diese Idee wird momentan untersucht und die bisher erhobenen Daten sind vielversprechend, müssen jedoch noch unterlegt werden.

#### 1.2.2 Transplantationen

Aufgrund der geringen spontanen und induzierten Regenerationsfähigkeit des Knorpels und den wenig definitiv befriedigenden Ergebnissen der oben genannten Therapien für ausgedehntere Defekte, werden Verfahren zur Transplantation von Knorpelgewebe angewandt.

Hierzu ist zu bemerken, daß die alleinige Transplantation von Knorpel keine Erfolge zeigt, da der transplantierte Knorpel nicht einheilt. Ebenfalls führt auch die Replantation von isolierten Knorpelflakes ohne knöchernen Unterlage nicht zum Erfolg [OUTERBRIDGE, 1995; BUCKWALTER, 2002]. Somit besteht die Notwendigkeit, bei einer Transplantation nicht nur das Knorpelgewebe,

sondern auch den darunterliegenden Knochen mit zu transplantieren [MATSUSUE, 1993, HANGODY, 1997; MEENEN, 1998; BURKART, 2001]. Hierzu wurden Studien durchgeführt, welche die Knorpel-Knochen-Heilung beobachten. Dabei wurden bei Tieren (z.B. Kaninchen) Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen und in Defekte eingesetzt, um später deren Einheilung zu untersuchen [CONVERY, 1991; BEAVER, 1992; HANGODY, 1997]. In Kaninchen zeigte sich im Bereich des ehemaligen Defektes eine hyaline Knorpelbildung mit der Fähigkeit zur enchondralen Ossifikation. So muß man aufgrund der differenzierten Knorpelbildung bei Implantation einer Knorpel-Knochen-Kombination davon ausgehen, daß durch das reiche Substrat- und Sauerstoffangebot aus den Markraumgefäßen ein Milieu geschaffen wird, welches demjenigen vor Ausbildung des subchondralen Knochens bei Wachstumsabschluß gleicht [OUTERBRIDGE, 1995].

#### 1.2.2.1 Autogene Transplantate

Die derzeit angewandte Therapie mit den größten klinischen Erfolgen ist die autogene osteochondrale Transplantation. Bei diesem erstmalig von Lexer 1908 [LEXER, 1908] vorgestellten Verfahren wird das defekte Gewebe durch einen körpereigenen Knorpel-Knochenzylinder ersetzt. Hierzu wird das geschädigte Knorpelareal mit dem darunterliegenden, meist mitgeschädigten Knochen ausgefräst. Der so entstandene Defekt wird durch einen intakten Knorpel-Knochen-Zylinder, welcher aus einer wenig belasteten Gelenkzone, z. B. dem patellaren Gleitlager, dem dorsalen Kondylenbereich oder aus dem Rand der Notch entnommen wird, ausgefüllt. Die Methode wurde von Matsusue et al [MATSUSUE, 1993] 1993 erneut aufgegriffen.

1972 führte Wagner [WAGNER, 1972] autogene Knorpel-Knochen-Transplantationen durch, wobei er den Patienten mit einer Fräse ein Zylinder aus dem dorsalen Anteil des Femurkondylus entnahm und diesen in den anterioren Defekt einsetzte. Bei 70% der so behandelten Patienten wurden bezüglich Schmerzfreiheit und Beweglichkeit in den Nachuntersuchungen 2-5 Jahre nach der Operation gute Ergebnisse verzeichnet. Bei 30% der Patienten traten keine Verbesserungen auf. Wagner führte dies auf die insuffiziente

Befestigung der Implantate, Überlastung oder die Inkongruenz der Gelenkflächen zurück.

In einer Studie konnte nach Durchführung der Knorpelknochen transplantation mit Hilfe eines diamantbesetzten und innengekühlten Fräsensystems (DBCS = Diamond Bone-Cutting System) nach durchschnittlich 24 Monaten postoperativ in 76,9 % sehr gute Ergebnisse erzielt werden [MEENEN, 1998].

Eine weitere Möglichkeit der osteochondralen Transplantation ist die von Hangody [HANGODY, 1997] beschriebene autogene osteochondrale Mosaikplastik. Mit einer Stanze werden hierbei 10-15 mm lange Zylinder aus der suprakondylären Gelenkfläche des Femurs entnommen und in den zuvor debridierten Defekt mosaikartig eingesetzt.

Der Unterschied zum DBCS ist, daß der Defekt nicht durch einen oder mehrere große ineinander verzahnte Zylinder, sondern durch mehrere kleine aneinandergestellte Zylinder gefüllt wird. In dieser Studie von Hangody waren 8 Wochen nach der Operation die Zylinder durch Faserknorpel untereinander und mit dem umgebenden Gewebe verbunden. Bei der klinischen Nachuntersuchung konnten bei 91% der Patienten gute bis exzellente Ergebnisse bezüglich der Schmerzfreiheit und Mobilität festgestellt werden.

Die Indikation zur osteochondralen, autologen Transplantation sind lokalisierte Knorpelschäden mit einer Größe von 1 cm<sup>2</sup> bis 10 cm<sup>2</sup> in der Belastungszone, Osteochondrosis dissecans- Herde sowie umschriebene Osteonekrosen. Größere Knorpeldefekte können, da hier die Gewinnung von geeigneten Transplantaten zunehmend auf Schwierigkeiten stößt, durch autogene Transplantation nicht behandelt werden [BOBIC, 1996; IMHOFF, 1999; BURKART, 2001].

Eine weitere Therapieoption stellt das Einbringen einer autogener Knorpel-Knochen-Paste in die Defektzone, wie sie Stone [STONE, 1997] beschreibt, dar. Es handelt sich hierbei um die Kombination aus subchondraler Stimulation und Transplantation. Dabei wird eine arthroskopisch entnommene autogene Kondylenstanze aus dem Notch-Eingang zu einer Paste verarbeitet und diese in den mikrofrakturierten und debridierten Knorpeldefekt eingepreßt.

### 1.2.2.2 Knorpel-Knochen-Allografts

Diese im anglo-amerikanischen Raum verbreitete Methode bietet den Vorteil der nahezu exakten anatomischen Rekonstruktion eines Defektes durch Verwendung eines entsprechenden Gelenkareals von einem Spender [GARRETT, 1993]. Es entsteht zwar kein Entnahmedefekt, aber die mittel- bis langfristigen Verlaufsbeobachtungen sind in der Regel schlecht, da die Chondrozyten die Konservierung (tiefgefroren oder bestrahlt) nicht überleben [BOBIC, 1996; IMHOFF, 2000].

Zusätzlich besteht bei dieser Behandlungsmethode die Gefahr der Übertragung von lebensbedrohlichen Infektionen, wie zum Beispiel HIV, Hepatitis oder der Creutzfeld-Jacob-Krankheit. Somit ist die Implantation von allogenen Gewebe möglichst zu vermeiden.

### 1.2.2.3 Periost und Perichondriumtransplantationen

Die Transplantation von Perichondrium in einen Knorpeldefekt wurde von Homminga et al. [HOMMINGA, 1991] eingeführt.

O`Driscoll und Salter [O`DRISCOLL, 1984; O`DRISCOLL, 1986 I; O`DRISCOLL, 1986 II] beschreiben ein analoges Verfahren, nur verwenden sie als Transplantat Periost. O`Driscoll konnte nachweisen, daß osteochondrale Defekte in Kniegelenken bei Hasen, die mit autologen Periostlappen behandelt wurden, ausheilten und dies mit zu 90% aus Typ II Kollagen bestehendem hyalinen Knorpel [O`DRISCOLL, 1986 I; O`DRISCOLL, 1986 II].

Beide Techniken basieren auf der Überlegung, daß dedifferenzierte, fibroblasten-ähnliche Zellen, die eine Potenz zur Chondrogenese besitzen und in biologischer Matrix fixiert sind, an den Ort eines Knorpeldefektes gebracht werden können. Das Periost wird meistens von der Tibia, das Perichondrium fast ausschließlich von Rippenknorpeln gewonnen. Die Transplantate werden dann mittels Fibrinkleber auf den Defekt geklebt oder eingenäht. Im positiven Fall findet dann ein Anwachsen des Transplantates auf dem debridierten subchondralen Knochen und dem umgebenden gesunden Knorpel statt [HOMMINGA, 1990; O`DRISCOLL, 1986 II]. Vorteile dieser Methode liegen in der Gewinnung von autologem, zellreichem Transplantationsmaterial.

Nachteilig ist, daß nur relativ kleine Knorpeldefekte so behandelt werden können und der operative Aufwand im Vergleich zu subchondral stimulierenden Verfahren deutlich höher ist. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß Periost und Perichondrium im Kniegelenk die Fähigkeit besitzen, hyalin-ähnlichen Knorpel zu bilden [DELANEY, 1989; GALLAY, 1994].

Gute Ergebnisse bezüglich der Funktion der Gelenke und der Symptome kurz nach der Operation haben erste Studien belegt. Langzeitergebnisse stehen aus [AMIEL, 1985; BULSTRA, 1990]. Perichondrium scheint dem Periost unterlegen, weil es häufiger zur Ossifikation neigt. [BRUNS, 1997]

#### 1.2.2.4 Autologe Chondrozytentransplantation

Bei diesem von Peterson 1984 [PETERSON, 1984] erstmalig im Tierversuch erprobten Verfahren wird zunächst aus einer unbelasteten Zone des verletzten Gelenkes eine kleine Knorpelbiopsie entnommen. Nach Isolierung der Chondrozyten aus diesem Gewebestück werden die Zellen in Monolayerkultur vermehrt. Die so entstandene Zellsuspension wird nun unter einen Periostlappen, welcher zuvor über den zu therapierenden Defekt genäht wurde, gespritzt. Der Periostlappen wird in der Regel von der Tibia entnommen.

Breinan veröffentlichte 1997 [BREINAN, 1997] die Ergebnisse einer experimentellen Studie, in der er im Kaninchen-Model Leerdefekte mit reinen Periosttransplantationen und autogenen Chondrozytentransplantationen verglich. Er konnte zeigen, daß keiner der Defekte mit hyalinem oder dem hyalinen Knorpel ähnlichem Gewebe ausgefüllt war.

Das sich in den Defekten befindliche Gewebe enthielt aber in allen Fällen reichlich Kollagen I, wie auch Mont zeigen konnte [MONT, 1999].

Peterson und Grande [GRANDE, 1987; GRANDE, 1989; PETERSON, 2000] berichteten im Gegensatz dazu jedoch über gute Ergebnisse. Die Defekte waren größtenteils durch eine dem hyalinem Knorpel-ähnliche Substanz aufgefüllt, Typ II Kollagen konnte nachgewiesen werden.

Auch die von Brittberg 1994 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Ergebnisse [BRITTBERG, 1994] zeigten gute Erfolge der autologen Chondrozytentransplantation. Er operierte 23 Patienten nach diesem Verfahren. In den klinischen Nachuntersuchungen wurde bei 16 Patienten über

gute bis exzellente Ergebnisse berichtet. In den im Rahmen einer Arthroskopie entnommenen Biopsien zeigte sich in 12 von 22 Proben dem hyalinen Knorpel ähnliches Gewebe. In der immunhistologischen Färbung konnte Kollagen Typ II nachgewiesen werden.

### **1.3 Tissue Engineering**

Die meisten bisher genannten Methoden zur Therapie von Gelenkknorpeldefekten bieten keine befriedigenden Ergebnisse und die Folge von Knorpelverletzungen, die Arthrose, bleibt in den meisten Fällen nicht aus. Die einzigen Verfahren, welche den Defekt nachhaltig mit für Gelenkflächen typischem hyalinem oder hyalinähnlichem Knorpel auffüllen, sind die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation in Form der Mosaic-Plastik oder der Transplantation mit dem DBCS-Instrumentarium [HANGODY, 1997; MEENEN, 1998; BURKART, 2001] und die sehr teure und aufwendige autologe Chondrozytentransplantation [BRITTBERG, 1994; PETERSON, 2000].

Ein großer Nachteil der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation besteht darin, daß der Entnahmedefekt ebenso groß wie das zu füllende Areal ist und damit objektiv ein zusätzlicher Gelenkdefekt in einem geringer belasteten Gelenkbereich gesetzt wird, der allerdings durch die Verbesserung der Situation in der zerstörten belasteten Gelenkregion teilweise kompensiert wird. Zusätzlich wächst der eingesetzte Knorpel meist an den Rändern nicht mit dem umliegenden Gelenkknorpel zusammen, woraus sich wiederum ein Knorpelverschleiß entwickeln kann.

Bei der autogenen Chondrozytentransplantation, bei der die Chondrozyten aus einer Biopsie in vitro expandiert und dann unter einen über den Defekt genähten Periostlappen implantiert werden, treten Entnahmefolgen nicht auf. Es entsteht lediglich ein sehr kleiner, rein chondraler Defekt. Der große Nachteil bei diesem Verfahren ist jedoch, daß kein differenziertes Knorpelgewebe transplantiert wird, sondern nur dedifferenzierte Bindegewebszellen, deren mögliche Redifferenzierung zu Zellen, die

knorpelähnliche Matrix produzieren, unkontrolliert im Knorpeldefekt erfolgt [TEMENOFF, 2000].

Die Kombination der unbestreitbaren Vorteile dieser beiden Verfahren, d.h. die Transplantation von strukturiertem differenzierten Knorpelgewebes mit nur minimaler Biopsieentnahme, würde die entscheidenden Anforderungen an ein ideales Therapieverfahren erfüllen. Die Züchtung von implantierbarem Gelenkknorpel in-vitro, welches nur durch moderne Gewebekulturmethoden möglich ist, da dabei die Erhaltung der phänotypischen Charakteristika der Chondrozyten erhalten bleibt, ermöglicht die definitive Kontrolle über den gesamten Prozeß der Zellfreisetzung, Proliferation, Differenzierung und Matrixproduktion.

#### **1.4 Substitutionsmethoden**

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse sowohl für die Knorpelheilung als auch für die Knorpel-Knochen-Heilung wurden weitere Methoden entwickelt, welche sich Ersatzmaterialien und Kombinationsmaterialien bedienen. So wurden eine Vielzahl von Trägersubstanzen und Gerüsten, die mit generierten Knorpelzellen bestückt wurden, zur Defektauffüllung benutzt. Zum Beispiel wurde mit Chondrocyten besiedeltes, sich später auflösendes poröses Poly-Lactat [CHU, 1995] eingesetzt, Polymere besiedelt [FREED, 1993; FREED, 1994; PUELACHER, 1994], Metallimplantate beschickt [KARAGIANES, 1975], Kollagenschwämme bestückt [CHVAPIL, 1977; SELLERS, 1997] oder Polyglycan-Acetat-Stäbe [RUUSKANEN, 1991] und Carbon-Stäbe [KANG, 1991; BRITTBERG, 1994] in das Gelenk eingesetzt. Auch wurden Dacron oder Teflon [MESSNER, 1993] benutzt sowie Menisken transplantiert [OCHI, 1995; SUMEN, 1995].

Bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate stellte sich jedoch heraus, daß sich diese Defekte auch nur mit bindegewebigen Regeneraten, jedoch nie mit hyalinem Knorpel auffüllten [GRANDE, 1997].

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Da Gelenkknorpel in vivo nur in sehr begrenztem Umfang in der Lage ist, Schädigungen wie z.B. Risse, Schnitte oder Gewebeverluste hyalin zu verheilen, soll diese Arbeit klären, ob

1) nativer Gelenkknorpel unter Zellkulturbedingungen verheilt.

Für die Behandlung von Knorpeldefekten wurden von unserer Arbeitsgruppe Knorpelstücke, die in die Defekte der Gelenkfläche implantiert werden können, im Labor mit den Methoden des Tissue Engineering produziert. Um nun die Eigenschaften dieses gezüchteten Knorpels näher zu bestimmen, soll die Arbeit weiter klären, ob

2) in vitro hergestellter Knorpel auch in vitro verheilt.

Da der gezüchtete Knorpel in einen Defekt aus nativem Knorpel implantiert wird, somit an den Rändern mit diesem Knorpel in Kontakt kommt und hier spaltlos verheilen muß, soll die Arbeit schließlich klären, ob

3) in vitro hergestellter Gelenkknorpel in vitro mit nativem Knorpel verheilt.

Damit wird ein in vitro Modell der Knorpelheilung vorgestellt. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß für die Untersuchung Gewebe verwendet werden kann, das mit dem Verfahren des Tissue Engineering erzeugt wurde. Mit diesem Prozeß wird man in Zukunft sicherlich eine breite Palette von Gewebearten ersetzen können. Von entscheidender Bedeutung für die zu erreichende Funktionalität ist aber der zu erreichende Kontakt mit dem Lagergewebe. Einerseits muß das Eindringen von Gelenkflüssigkeit in verbliebene Spalträume verhindert und andererseits die Kraffteinleitung und –vermittlung durch überbrückende Kollagenfasertexturen erreicht werden.

Die Heilung wird mit morphologischen Kriterien nachgewiesen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsgruppen**

Zur Klärung der Frage, ob Knorpel verheilen kann, wurden 3 verschiedene Versuchsgruppen durchgeführt. Hierbei wurde nicht nur untersucht, ob nativer Gelenkknorpel unter Kulturbedingungen zusammenheilt, sondern auch ob in Kultur gezüchteter Knorpel die Kapazität zur Heilung aufweist. Um eine Brücke zur klinischen Anwendung zu schlagen, wurde zusätzlich die wichtige Frage bearbeitet, ob in Kultur gewonnener Knorpel mit nativem Knorpel unter Kulturbedingungen zusammenwächst.

#### **2.1.1 Gruppe 1: Heilungsverhalten von nativem Knorpel**

In dieser ersten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob nativer Gelenkknorpel in der Lage ist, ex vivo zusammen zu heilen. Hierzu wurden aus den Kniegelenksflächen von Miniaturschweinen Knorpelflakes entnommen, auseinandergeschnitten, zusammengenäht und während der Heilungsphase unter Kulturbedingungen gehalten. Nach 3 Wochen wurde eine histologische, immunhistologische und rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Kontaktfläche durchgeführt.

#### **2.1.2 Gruppe 2: Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel**

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob in Kultur gezüchtetes Knorpelgewebe in der Lage ist zu verheilen. Hierzu wurde aus der Gelenkfläche des Kniegelenkes eines Miniaturschweines Knorpel entnommen. Die Chondrozyten wurden isoliert und in Kultur vermehrt. Anschließend erfolgte die Redifferenzierung der Zellen sowie die Herstellung von Knorpel pellets.

Diese Pellets wurden durchtrennt, zusammengenäht und unter Kulturbedingungen gehalten. Nach 3 Wochen wurde eine histologische, immunhistologische und rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Schnittfläche durchgeführt.

### 2.1.3 Gruppe 3: Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel in Kombination mit nativem Knorpel

In der letzten Versuchsreihe sollte nun untersucht werden, ob in Kultur gezüchtetes Knorpelgewebe in der Lage ist mit nativem Gelenknorpel zusammenzuwachsen. Hierzu wurden wie in Gruppe 2 Chondrozyten aus der Gelenkfläche des Kniegelenkes eines Miniaturschweines entnommen und nach Dedifferenzierung, Vermehrung und anschließender Redifferenzierung Pellets hergestellt.

Diese Pellets wurden mit nativem Knorpel, der aus der Gelenkfläche desselben Schweines, wie in Gruppe 1, entnommen wurde, zusammengeñät. Nach 3 Wochen unter Kulturbedingungen wurde eine histologische, immunhistologische und rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Kontaktfläche durchgeführt.

## **2.2 Methoden der Versuchsreihen**

### 2.2.1 Knorpelgewinnung

Der Knorpel für alle 3 Versuchsreihen wurde aus Kniegelenken und Ellenbogen von männlichen und weiblichen Gallinger Miniaturschweinen entnommen. Das Alter lag im Mittel bei 25 Monaten, ihr Gewicht betrug im Mittel 60 kg. Die Tiere befanden sich in Gemeinschaftsställen in einer Gruppe von maximal zwei Tieren.

12 Stunden vor der Operation erhielten die Schweine kein Futter und Wasser mehr. Das Knorpelmaterial wurde unter sterilen Bedingungen entnommen. Postoperativ erhielten die Versuchstiere Analgetika zur Schmerzbeseitigung.

#### 2.2.1.1 Narkotisierung

Die Versuchstiere wurden mit 5 ml Stresnil (200 mg Azaperon) sowie 5 ml Ketamin 10 (500 mg Ketaminhydrochlorid) i.m. sediert. Anschließend wurde ein

peripherer Venenkatheter ins äußere Ohr gelegt, worüber die i.v. Narkose mit Propofol Lipuro 1% (8-12 ml/Stunde) gegeben wurde.

#### 2.2.1.2 Entnahmetechnik

Die Miniaturschweine wurden auf den Rücken gelagert und die Knieregion rasiert und desinfiziert.

Nach sterilem Abdecken erfolgte eine ca. 3 cm lange Inzision antero-lateral der Kniescheibe. Durch kleine Wundhaken wurde Haut und Unterhautgewebe zur Seite gehalten. Nach Gelenkeröffnung wurden mittels eines Skalpell der Größe 11 ca. 0,5 x 0,5 cm große Knorpelflakes von den Gelenkflächen abgeschält und in ein Probenröhrchen, gefüllt mit steriler PBS-Lösung, gegeben. Bei der Knorpelentnahme wurde streng darauf geachtet, daß Blut- oder andere Gewebebestandteile nicht entnommen wurden.

Anschließend wurde ein schichtweiser Wundverschluß durchgeführt.

Intraoperativ wurde Elzogram 1,0 gewichtsadaptiert mit 1-2 g als single-shot gegeben.

Postoperativ wurde eine Analgesie mit Tramal und Novalgin Tropfen p.o. sowie Novalgin supp. verordnet, zusätzlich wurde eine Nulldiät für fünf Stunden angesetzt. Es kam zu keinerlei Komplikationen intra- oder postoperativ, so daß keine weiteren Beschränkungen notwendig waren.

In der dritten Versuchsreihe wurden die Tiere acht Wochen nach der Knorpelentnahme erneut sediert und anschließend mit einer Überdosis T 61 getötet. Nach Hautschnitt und freipräparieren der Gelenkfläche wurden Knorpelflakes abgeschält und in ein Probenröhrchen mit steriler PBS-Lösung gegeben.

#### 2.2.1.2.1 Materialien

##### Instrumente:

- Beatmungsgerät, Bennet, Respiration Unit Model MA-1B / SIMV / CPAP, Hoyer, Bremen, Germany
- Perfusor ED 1-300, B. Braun-Melsungen AG, Melsungen, Germany

- Pulsoxymeter Type F-CM.04, Firma Datex-Ohmeda-Division, Duisburg, Germany
- Ethylenoxid-Sterilisator, DMB Apparatebau, Wiesbaden, Germany

#### Verbrauchsmaterialien:

- Probenröhrchen steril 50 ml, Greiner Labortechnik
- Sterile Einmalskalpelle Nr. 15/21/11, Cutfix, B. Braun Dexon GmbH, Spangenberg, Germany
- Steriles Nahtmaterial: Vicryl 3/0 (2 metric) JRB-1, 8x45 cm, Ethicon, Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien
- Steriles Nahtmaterial: Ethilon 3/0 (2 metric) PS-1, 24 mm, 3/8c, Ethicon, Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien
- Sterile periphere Venenverweilkatheter: Vasofix Braunüle, Luer Lock, 20G, 61 ml/min, B. Braun-Melsungen AG, Melsungen, Germany
- Sterile Latex-OP-Handschuhe Größe 7, NuTEX, Ansell Malaysia Sdn. Bhd, Melaka, Malaysia
- Sterile selbstklebende OP-Abdecktücher, Foliodrape 75x90 cm, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Germany

#### Chemikalien:

- Stresnil (Azaperon; 40 mg/ml) 100 ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany
- T 61 für Tiere (200 mg Embutramid/ml, 50 mg Mebzonium-Jodid/ml, 5 mg Tetracainhydrochlorid/ml) 50 ml, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany
- Ketamin 10 (Ketaminhydrochlorid; 100 mg/ml) 10 ml, Atarost GmbH & Co, Twistringen, Germany
- Propofol Lipuro 1% (10 mg/ml) 20 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
- Elzogram 1,0 (Cefazolin-Natrium), 1g, Lilly Deutschland GmbH, Gießen, Germany
- Novaminsulfon-ratiopharm Tropfen (Metamizol-Natrium; 500 mg/ml), 50 ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Germany

- Novaminsulfon-ratiopharm Zäpfchen 100 mg (Metamizol-Natrium), ratiopharm GmbH, Ulm, Germany
- Tramal Tropfen (Tramadolhydrochlorid; 100 mg/ml), 48 ml, Grünenthal GmbH, Aachen, Germany

### 2.2.1.3 Chondrozytenisolierung

Der Matrixverdauung zur Chondrozytenisolierung erfolgte in sechs Schritten. Die jeweilige Verdauungslösung wurde dazu über die in der Petrischale befindlichen Knorpelstückchen gegeben.

Der Abbau der extrazellulären Matrix erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Durch intermittierendes Umrühren wurde gewährleistet, daß der Abbau an allen Seiten der Knorpelstückchen ansetzte. Nach den genannten Verdauungszeiten mittels Kollagenase (Schritte 4-6, siehe Tabelle 1) wurden die jeweils entstandenen Suspensionen abgesogen, in ein steriles Probenröhrchen überführt und bei 1500 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen mit Nährmedium zur Dedifferenzierung versorgt und im Brutschrank aufbewahrt.

Tabelle 1

Schritt	Verdauungslösung	Dauer
1	25 mg Hyaluronidase III in 50 ml PBS	25 Minuten
2	50 ml Trypsin-EDTA	45 Minuten
3	50 ml Nährmedium + 10% FKS (Waschvorgang)	5 Minuten
4	25 mg Kollagenase Ia in 50 ml Dulbeccos MEM + 10% FKS	120 Minuten
5	25 mg Kollagenase Ia in 50 ml Dulbeccos MEM + 10% FKS	120 Minuten
6	25 mg Kollagenase Ia in 50 ml Dulbeccos MEM + 10% FKS	12 Stunden

Nach Abschluß der Verdauung wurden die Zellsuspensionen aus den Schritten 4 bis 6 aufsuspendiert und jeweils 500 µl zur Zellzählung entnommen. Im Verdauungsschritt 4 war eine durchschnittliche Zellzahl von 500 000 Zellen erreicht, bei dem nächsten Verdauungsschritt 5 konnten im Schnitt 1,6 Millionen und im 6. Schritt im Schnitt 1,2 Millionen Zellen erreicht werden. Schließlich wurden die Zelllösungen auf drei Kulturflaschen verteilt.

#### 2.2.1.3.1 Materialien

##### Instrumente:

- Brutschrank Heraeus Begasungsschrank B5060 EC/CO<sub>2</sub>
- Ethylenoxid-Sterilisator, DMB Apparatebau, Wiesbaden, Germany
- Mikroskop Diavert, Serien-Nr.: 976099, Leica, Bensheim, Germany
- Casy 1 Model TT, Cell Counter and Analyser System, Schärfe System, Germany
- Sterilbank, MDH, Microflow Safety Cabinet
- Waage, PM 460 Delta Range, Mettler, Germany
- Zentrifuge Universal 16, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
- Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Pipetus-Stand, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Finnpipette, 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Labsystems

##### Verbrauchsmaterialien:

- Kulturflaschen, Greiner, Volumen: 650 ml, Seitenfläche: 182 cm<sub>2</sub>
- Petrischalen mit Deckel, Typ 100x15 mm, steril, Falcon, Decton Dickinson Labware, New Jersey, USA
- Probenröhrchen steril 50 ml und 15 ml, Greiner Labortechnik
- Sterilfilter, Porengröße 45 µm, Sartorius
- Steriles Einmalskalpell Nr. 11, Cutfix, B. Braun Dexon GmbH, Spangenberg, Germany
- Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Greiner Labortechnik

- Sterile Plastikpipetten, serological pipet, 5 ml, 10 ml, 25 ml, with plug, Falcon Advantage, Decton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France
- Unsterile Handschuhe, Größe M, satin plus, Safeskin Corp., San Diego, USA
- Sterile Latex-OP-Handschuhe Größe 7, NuTEX, Ansell Malaysia Sdn. Bhd, Melaka, Malaysia
- Sterile Einmalspritzen 20 ml, B. Braun-Melsungen AG, Melsungen, Germany
- Spritzenvorsatzfilter, steril, 0,22 µm, CM-Membran, Qualilab für Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, Germany

#### Chemikalien:

- Aqua dest., Apotheke UKE, Hamburg
- Dulbeccos MEM HEPES, Gibco, Paisley, Scotland
- Hyaluronidase III, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Kollagenase Ia, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Genzyme
- Recombinant Human Epidermic Growth Factor (EGF), Genzyme
- Trypsin-EDTA (1x) 100 ml, Gibco, Paisley, Scotland
- Penicillin-Streptomycin-Solution, 100 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Fetal Bovine Serum, E.U. Approved Origin (South America), 500 ml, Mycoplasma and Virus screened, Performance tested, Life Technologies, Gibco, Paisley, Scotland
- PBS Dulbecco's, Phosphate Buffered Saline, 500 ml, Gibco, Paisley, Scotland
- Ethanol, Merck, Darmstadt

#### Ansätze:

- Nährmedium zur Dedifferenzierung der Zellen: Dulbeccos MEM HEPES, Gibco + 10% fetales Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin-Solution + 0,01 % FGF + 0,001% EGF

#### 2.2.1.4 Zellkultur

Die isolierten Chondrozyten wurden zusammen mit der Nährlösung zur Proliferation auf Kulturflaschen verteilt und in den Brutschrank überführt. Die Wachstumsfaktoren EGF und FGF wurden, um die Proliferation zu beschleunigen, zugesetzt.

Täglich wurden die Kulturen unter dem Mikroskop kontrolliert. Anhand der Zellmorphologie konnte festgestellt werden, ob sich die Zellen vermehrt sowie dedifferenziert hatten und ob sie auf dem Flaschenboden angewachsen waren. Nach Konfluenz der Zellen, durchschnittlich nach ca. 4 bis 5 Tagen, wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt.

Nach ca. 5 bis 7 Tagen war schließlich der Flaschenboden mit einem dichten Zellrasen bewachsen. Das Nährmedium wurde nun unter der Sterilbank abgesogen, die Zellen mit steriler PBS-Lösung gewaschen und mit 8 ml Trypsin-EDTA umspült. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank von fünf Minuten wurden die Flaschen kräftig beklopft, wodurch sich der größte Teil der Chondrozyten von der Kulturflasche löste. Die Reaktion des Trypsins wurde schließlich mittels der Zugabe von 10 ml Nährmedium gestoppt. Nun wurden die Zellen zu gleichen Teilen aus einer Flasche auf zwei Flaschen verteilt, mit 20 ml angereichertem Medium aufgefüllt und ca. 500 µl zur Zellzählung entnommen. Bei der Zellzählung ergab sich im Schnitt eine Verdreifachung der Zellen innerhalb von sieben Tagen. Die Zellen wurden nun jeden vierten Tag trypsiniert. Die Nährlösung zur Dedifferenzierung wurde alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt.

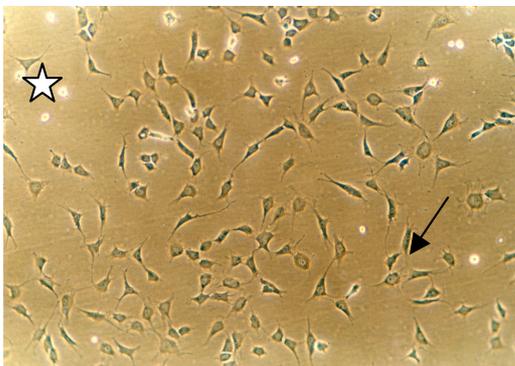


Abb. 9: Fibroblasten-ähnliche Zellen (Pfeil) und Chondrozyten (Stern) in vitro Kultur 3 Tage nach Isolierung.

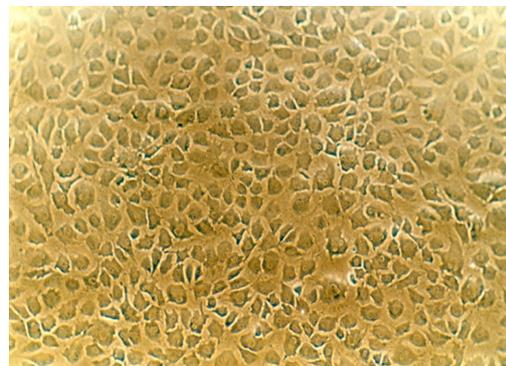


Abb. 10: Fibroblasten-ähnliche Zellen in vitro Kultur 7 Tage nach Isolierung.

#### 2.2.1.4.1 Materialien

##### Instrumente:

- Brutschrank Heraeus Begasungsschrank B5060 EC/CO<sub>2</sub>
- Mikroskop Diavert, Serien-Nr.: 976099, Leica, Bensheim, Germany
- Casy 1 Model TT, Cell Counter and Analyser System, Schärfe System, Germany
- Sterilbank, MDH, Microflow Safety Cabinet
- Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Pipetus-Stand, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Finnpipette, 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Labsystems

##### Verbrauchsmaterialien:

- Kulturflaschen, Greiner, Volumen: 650 ml, Seitenfläche: 182 cm<sup>2</sup>
- Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Greiner Labortechnik
- Sterile Plastikpipetten, serological pipet, 5 ml, 10 ml, 25 ml, with plug, Falcon Advantage, Decton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France
- Unsterile Handschuhe, Größe M, satin plus, Safeskin Corp., San Diego, USA

##### Chemikalien:

- Aqua dest., Apotheke UKE, Hamburg
- Dulbeccos MEM HEPES, Gibco, Paisley, Scotland
- Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Genzyme
- Recombinant Human Epidermic Growth Factor (EGF), Genzyme
- Trypsin-EDTA (1x) 100 ml, Gibco, Paisley, Scotland
- Penicillin-Streptomycin-Solution, 100 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Fetal Bovine Serum, E.U. Approved Origin (South America), 500 ml, Mycoplasma and Virus screened, Performance tested, Life Technologies, Gibco, Paisley, Scotland

- PBS Dulbecco`s, Phosphate Buffered Saline, 500 ml, Gibco, Paisley, Scotland

#### Ansätze:

- Nährmedium zur Dedifferenzierung der Zellen: Dulbeccos MEM Hapes, Gibco + 10% fetales Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin-Solution + 0,01 % FGF + 0,001% EGF

#### 2.2.1.5 Einbettung der Chondrozyten in Alginate

Nachdem eine ausreichende Anzahl von Chondrozyten gewachsen war, wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgezogen und die Zellen mit steriler PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde pro Flasche 8 ml Trypsin hinzu gegeben und die Flaschen für fünf Minuten zurück in den Brutschrank gelegt. Nach Entnahme der Flaschen wurden diese, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, kräftig beklopft. Die Wirkung des Trypsins wurde mit 10 ml Stopp-Medium neutralisiert. Die Zellen wurden gut aufsuspendiert und schließlich auf 50 ml Probenröhrchen verteilt. Schließlich wurden jeweils 500 µl zur Zellzählung entnommen und die Zellen bei 1500 U/min für fünf Minuten abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 1-fach Waschpuffer gewaschen, im Mittel 1 ml pro 1 Millionen Zellen. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann wurde 2-fach Waschpuffer (0,5 ml/1 Mio. Zellen) und nachfolgend Alginate 2,4% (0,5 ml/1 Mio. Zellen) hinzu gegeben und alles gut aufsuspendiert. Gleichzeitig wurde ca. 200-250 ml Calcium-Puffer in einen Erlenmeyerkolben vorgelegt.

Die Zellen-Alginate-Suspension wurde nun mittels einer gängigen, sterilen 25 ml fassenden Plastikpipette in den Calcium-Puffer getropft. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Mündung der Pipette maximal einen halben Zentimeter über dem Puffer gehalten wurde.

So erhielt man gleichmäßige runde Alginate-Beads, in denen sich die Chondrozyten zwei Wochen in einer dreidimensionalen Anordnung redifferenzieren sollten.

Um ein Verklumpen der Beads zu vermeiden, wurde der Erlenmeyerkolben während des Tropfvorganges ständig geschwenkt. Nach dem Tropfvorgang härteten die Beads im Calcium-Puffer 20 bis 30 Minuten aus. Schließlich wurde der Puffer abgesaugt und es folgten zwei Waschvorgänge mittels 1-fach Waschpuffer.

Als letztes wurde Medium zur Redifferenzierung hinzugegeben und die Beads im Brutschrank bebrütet. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

#### 2.2.1.5.1 Materialien

##### Instrumente:

- Brutschrank Heraeus Begasungsschrank B5060 EC/CO<sub>2</sub>
- Mikroskop Diavert, Serien-Nr.: 976099, Leica, Bensheim, Germany
- Casy 1 Model TT, Cell Counter and Analyser System, Schärfe System, Germany
- Sterilbank, MDH, Microflow Safety Cabinet
- Ethylenoxid-Sterilisator, DMB Apparatebau, Wiesbaden, Germany
- Waage, PM 460 Delta Range, Mettler, Germany
- Zentrifuge Universal 16, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen. Germany
- Erlenmeyerkolben 300 ml, Schott Duran, Germany
- Glasflasche, 500 ml, Biochrom KG, Berlin, Germany
- Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Pipetus-Stand, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Finnpipette, 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Labsystems

##### Verbrauchsmaterialien:

- Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Greiner Labortechnik
- Sterile Plastikpipetten, serological pipet, 5 ml, 10 ml, 25 ml, with plug, Falcon Advantage, Decton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France
- Probenröhrchen steril, 50 ml und 15 ml, Greiner Labortechnik
- Unsterile Handschuhe, Größe M, satin plus, Safeskin Corp., San Diego, USA

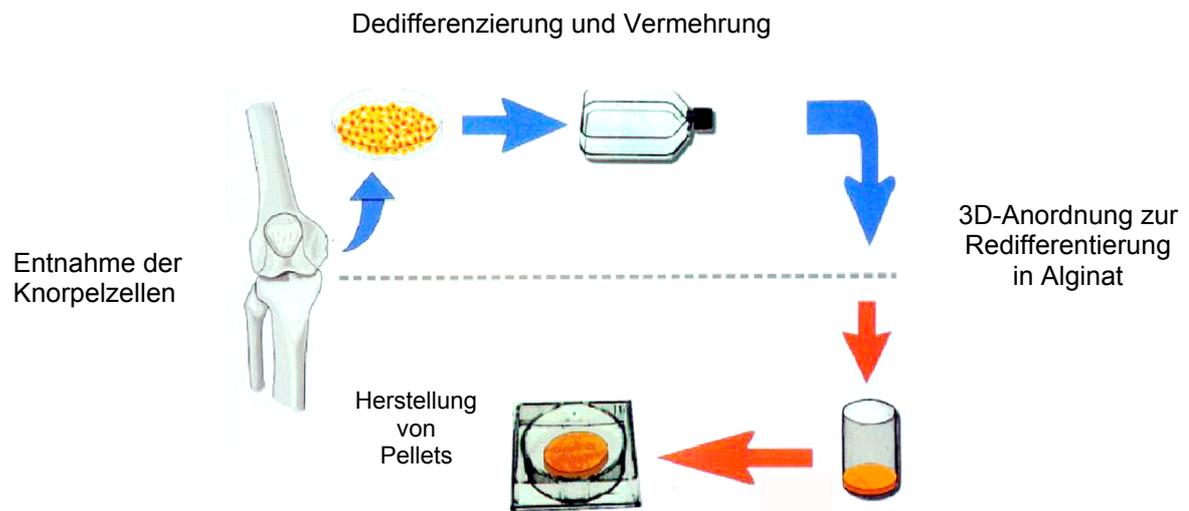
### Chemikalien:

- Dulbeccos MEM HEPES, Gibco, Paisley, Scotland
- Recombinant Human Tissue Growth Factor (TGF  $\beta$ 1), Genzyme
- Recombinant Human Insulin Growth Factor (IGF), Genzyme
- Penicillin-Streptomycin-Solution, 100 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Porcine Serum, E.U. Approved Origin, 500 ml, Mycoplasma and Virus screened, Performance tested, Life Technologies, Gibco, Paisley, Scotland
- Alginic Acid, Sodium Salt, from *Macrocystis pyrifera* (Kelp), low viscosity, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES) Puffersubstanz, Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
- Calciumchlorid-Dihydrat, Merck, Darmstadt
- PBS Dulbecco's, Phosphate Buffered Saline, 500 ml, Gibco, Paisley, Scotland
- Ethanol, Merck, Darmstadt
- L-Cystein, Merck, Darmstadt
- Ascorbinsäure-2-Phosphat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany

### Ansätze:

- Nährmedium zur Redifferenzierung der Zellen: Dulbeccos MEM HEPES, Gibco + 10% Schweineserum+ 1% Penicillin-Streptomycin-Solution + 0,1 % IGF + 0,1% TGF + 1% ASAP/C
- 1-fach Waschlösung:  
8,766 g/l NaCl 150 mM, 5,957 g/l HEPES 25 mM, pH 7,4 mit Aqua dest.
- 2-fach Waschlösung:  
17,532 g/l NaCl 150 mM, 11,914 g/l HEPES 25 mM, pH 7,4 mit Aqua dest.
- Alginate: 2,4% Alginate Acid in Aqua dest.
- Calcium-Puffer:  
14,702 g/l  $\text{CaCl}_2$  100 mM, 5,957 g/l HEPES 25 mM, pH 7,4 mit Aqua dest.
- ASAP/C: Ascorbinsäure-2-Phosphat und L-Cystein 1:1

### 2.2.1.6 Herstellung der Pellets



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der Herstellung von Pellets mit Knorpelentnahme, Chondrozytenisolierung, Vermehrung, Dedifferenzierung und Redifferenzierung in Alginat .

Nachdem sich die Chondrozyten zwei Wochen im Alginat redifferenziert hatten, wurden sie dem Brutschrank entnommen und das Medium abgesaugt. Danach wurden die Alginat-Beads mit 1-fach Waschpuffer gewaschen und schließlich in Citrat-Puffer (ca. 5 ml/ 1 Mio. Zellen) bei 37 °C eine halbe Stunde lang, aufgelöst. Die Lösung wurde auf mehrere Probenröhrchen verteilt und bei 1500 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit Medium zur Redifferenzierung aufsuspendiert und 500 µl zur Zellzählung entnommen.

Anschließend wurde die Zellsuspension auf verschiedene Probenröhrchen mit 1 Millionen Zellen/Röhrchen verteilt und erneut bei 1500 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zum Zellhaufen 3 ml angereichertes Medium zur Redifferenzierung gefügt. Zuletzt wurde erneut zentrifugiert und die Probenröhrchen wanderten für zwei Tage in

den Brutschrank bei 37°C. Nach diesen zwei Tagen wurden die Pellets mittels einer sterilen Pinzette aus den Probenröhrchen entnommen und in Wells, die zuvor mit Agarose (1%) beschichtet wurden, gegeben.

Pro Pellet und Well wurde jeweils 3 ml Medium zur Redifferenzierung hinzugefügt. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

#### 2.2.1.6.1 Materialien

##### Instrumente:

- Brutschrank Heraeus Begasungsschrank B5060 EC/CO<sub>2</sub>
- Mikroskop Diavert, Serien-Nr.: 976099, Leica, Bensheim, Germany
- Casy 1 Model TT, Cell Counter and Analyser System, Schärfe System, Germany
- Ethylenoxid-Sterilisator, DMB Apparatebau, Wiesbaden, Germany
- Zentrifuge Universal 16, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
- Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Pipetus-Stand, Hirschmann Laborgeräte, Germany
- Finnpipette, 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Labsystems
- Sterilbank, MDH, Microflow Safety Cabinet
- Glasflaschen, 500 ml, Biochrom KG, Berlin, Germany

##### Verbrauchsmaterialien:

- Corning cell wells, 12 well, flat bottom, Corning glass works, Corning, USA
- Corning cell wells, 6 well, flat bottom, Corning glass works, Corning, USA
- Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Greiner Labortechnik
- Sterile Plastikpipetten, serological pipet, 5 ml, 10 ml, 25 ml, with plug, Falcon Advantage, Decton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France
- Probenröhrchen steril 50 und 15 ml, Greiner Labortechnik

##### Chemikalien:

- Aqua dest., Apotheke UKE, Hamburg
- Dulbeccos MEM HEPES, Gibco, Paisley, Scotland

- Recombinant Human Tissue Growth Factor (TGF  $\beta$ 1), Genzyme
- Recombinant Human Insulin Growth Factor (IGF), Genzyme
- Penicillin-Streptomycin-Solution, 100 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Porcine Serum, E.U. Approved Origin, 500 ml, Mycoplasma and Virus screened, Performance tested, Life Technologies, Gibco, Paisley, Scotland
- PBS Dulbecco`s, Phosphate Buffered Saline, 500 ml, Gibco, Paisley, Scotland
- Ascorbinsäure-2-Phosphat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- L-Cystein, Merck, Darmstadt, Germany
- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES) Puffersubstanz, Merck, Darmstadt
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
- Agarose Typ VII: Low Gelling, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Penicillin-Streptomycin-Solution, 100 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
- Ethanol, Merck, Darmstadt

#### Ansätze:

- Nährmedium zur Redifferenzierung der Zellen: Dulbeccos MEM HEPES, Gibco + 10% Schweineserum+ 1% Penicillin-Streptomycin-Solution + 0,1 % IGF + 0,1% TGF + 1% ASAP/C
- 1-fach Waschpuffer:  
8,766 g/l NaCl 150 mM, 5,957 g/l HEPES 25 mM, pH 7,4 mit Aqua dest.
- Citrat-Puffer:  
16,176 g/, tri-Natriumcitrat 55 mM, 5,957 g/l HEPES 25 mM. PH 7,4 mit Aqua dest.
- ASAP/C: Ascorbinsäure-2-Phosphat und L-Cystein 1:1

## 2.2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.2.1 Gruppe 1: Naht von nativem mit nativem Knorpel

Die entnommenen Knorpelflakes wurden unter der Sterilbank auf ein steriles Tuch gelegt. Mittels eines 11er Skalpells wurde zentral eine ca. 4 bis 6 mm lange Inzision gesetzt. Nachfolgend wurde diese mittels Nahtmaterial der Fadenstärke 6/0 verschlossen. Anschließend wurde je eines der genähten Knorpelstückchen in ein Well (beschichtet mit 1% Agarose) gelegt und mit je 4 ml Nährmedium zur Redifferenzierung versetzt und im Brutschrank inkubiert. Das Medium mit den oben genannten Zusätzen wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach 21 Tagen wurden die genähten Knorpelstückchen in Fixiermedium gelegt.

### 2.2.2.2 Gruppe 2: Naht von gezüchtetem Knorpel (Pellet / Pellet)

Für die zweite Versuchsreihe wurden Pellets erzeugt.



Abb. 12: Ein in vitro hergestelltes Pellet nach 14 Tagen. Unter Kulturbedingungen im Brutschrank gehalten. Linkes Bild: nativ. Mittleres Bild: nach Schnitt mittels eines Skalpells der Größe 11. Rechtes Bild: nach Verschuß des gesetzten Schnittes mittels eines Fadens der Stärke 6/0.

Die Nährlösung wurde alle zwei Tage vorsichtig gewechselt.

Nach 14 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Beads mit Waschpuffer gewaschen und mit Citrat-Puffer aufgelöst. Durch Zellzählung wurde die Anzahl der verbliebenen Chondrozyten eruiert. Diese wurden nun zu Pellets mit entweder 500 000 Zellen/Pellet oder mit 1 Millionen Zellen/Pellet verarbeitet. Die Pellets reiften und wuchsen 14 Tage im Brutschrank. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen.

Nach zwei Wochen wurde schließlich bei einem Teil der Pellets unter der Sterilbank, mittels eines Skalpells der Größe 11, eine zentrale Inzision mit einer Länge von 4 mm gesetzt und nachfolgend der Spalt mittels Nahtmaterial verschlossen. Die restlichen Pellets wurden jeweils als Paar aneinander gelegt und zusammengenäht. Die genähten Pellets wurden in mit Agarose beschichtete Wells gegeben und mit jeweils 3 ml angereichertem Medium (10% Schweineserum, 1% Penicillin-Streptomycin-Solution, 1% ASAP/C sowie 0,1% IGF und TGF) versetzt. Das Medium wurde weiterhin alle zwei Tage gewechselt. Nach 21 Tagen wurden die genähten Pellets entnommen und in 4 % Formalin bzw. in 3% Glutaraldehyd überführt.

### 2.2.2.3 Gruppe 3: Naht von Pellet mit nativem Knorpel

Die Knorpelflakes, die aus den Versuchstieren der dritten Reihe stammten, wurde die Matrix verdaut und die Chondrozyten isoliert. Sie dedifferenzierten sich über zwei Wochen. Die Kulturflaschen wurden alle vier Tage trypsinisiert, das Medium alle zwei Tage gewechselt. Zuletzt wurden die Zellen zur Redifferenzierung in Alginat eingebettet.

Nach zwei Wochen, in denen alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, erfolgte die Elution der Chondrozyten aus dem Alginat mittels Citrat-Puffer. Die Zellen wurden zu Pellets von 1 Mio. Zellen/Pellet weiter verarbeitet. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Entnahme mehrerer Knorpelflakes aus den Knie- und Ellenbogengelenken der Tiere. Diese Knorpelstückchen wurden in sterile PBS-Lösung gegeben und unter der Sterilbank von Gewebe- sowie Blutresten befreit. Schließlich wurden sie halbiert und mit den ebenfalls halbierten Pellets vernäht. Jeweils ein so entstandenes Paar wurde in ein mit

Agarose beschichtetes Well überführt und mit angereichertem Medium versorgt. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Nach 21 Tagen wurden diese in-vitro/ex-vivo- Verbunde entnommen und in 4% Formalin bzw. in 3% Glutaraldehyd übergeben.

## **2.3 Auswertungsverfahren**

### 2.3.1 Material der Auswertungsverfahren

#### 2.3.1.1 Instrumente

- Autotechnikon, Enno Vieth, Mikrotome GmbH, Wiesmoor, Germany
- Schlittenmikrotom, Mikrotome GmbH, Wiesmoor, Germany
- Rasterelektronenmikroskop, Digital Scanning Microscope DSM 940, Carl Zeiss
- Metallgußform für Paraffinschnitte
- Wärmepinzette, Shandon GmbH, Berlin, Germany
- Wärmeplatte, Medax Nagel KG, Kiel, Germany
- Wärmebad, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany
- Spattercoater, SEM coating system, Bio-Rad Microscience Division, Hertfordshire, United Kingdom
- Kritisch-Punkt-Trockner, Balzers Union, Schweiz
- Mikroskop Zeiss Axioskop 2, Carl Zeiss
- Kamera Axio Cam color, Ser. Nr.: 232000963, Carl Zeiss
- Glasküvetten für 10 und 20 für Objektträger
- Feuchtkammer aus Plastik mit 5 Fächern und durchsichtigem Deckel, 26,5 x 5,5 x 11 cm
- Brutschrank Heraeus Wärmeschrank, B 5042 E
- Paraffinspender, Parafix, Medax Nagel GmbH, Kiel, Germany
- Wärmebad für Paraffin, Medax Nagel GmbH, Kiel, Germany

### 2.3.1.2 Verbrauchsmaterial

- Plastikgitter, Tissue-Tek, Biopsy Cassette 4090, Miles Inc. Diagnostics Division, Elkhart, IN 46515, USA
- Mikrotomöl, Mikrotome GmbH, Wiesmoor, Germany
- Einwegmesser für Mikrotome R35, Mikrotome GmbH, Wiesmoor, Germany
- Objektträger für Standardfärbungen für Paraffinschnitte
- Super Frost Plus Objektträger für Immunhistologien, Menzel Gläser, Germany
- Deckgläser 24x60 mm und 24x32 mm No. 1, Marienfeld, Germany
- Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Greiner Labortechnik
- Fettstift: DAKO Pen, Code No. 52002, DAKO A/S, Denmark
- Unsterile Einweg-Tropfpipetten: Pasteur Pipette, Code No. 202C, graduated up to 1 ml, Copan Italia, Brescia, Italy
- Linsenpapier, ca. 90x75 mm, 500 Blatt, No. 1019, Assistant, Germany

### 2.3.1.3 Chemikalien

- Eiweiß-Glycerol 85% konserviert, Apotheke, UKE
- Toluidine Blue O, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- DPX (Mountant for Histologie, Fluka Chemie AG, Budes, Schweiz
- Xylene (Melange D`Isomeres), Lot. 04040203, 2,5 Liter, SDS Peypin, France
- Formalin, Merck, Darmstadt
- Ethanol, Merck, Darmstadt
- Gewebeeinbettmittel: Paraffin Histo. Comp., Fogel Medizinische Technik und Elektronik, Gießen, Deutschland
- Aqua dest., hergestellt mit Seralpur Pro 90 CN, Seral
- Mayer Hämalan Merck, Darmstadt
- HCL, Merck, Darmstadt
- 0,1% Salzsäure, Apotheke, UKE
- Eosin gelblich, Merck, Darmstadt

- Methanol reinst, Merck, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid 30%, Merck, Darmstadt
- Pepsin Solution, Neo Markers, Fremont, Canada
- Kollagen - I und Collagen II - Antikörper, Abcam LTD., Cambridge, England
- Albumin Fraktion V (aus Rinderserum) für biochemische Zwecke, Merck, Darmstadt
- DAKO Liquid DAB (Diaminobenzidin) + Substrate, Chromogen System 15 ml, DAKO Corporation, Carpinteria, USA
- Tris Base, ultra pure, 1 kg, Cat. No. 15504-802, Life Technologies, Gibco BRL, Paisley, Scotland
- Trizma Hydrochloride, 1 kg, Lot. 100K5452, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
- Sodium Chloride, crystal, „Baker analyzed“, 54,44 g/mol, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
- Streptavidin / HRP, Code No. PO398, 1 ml, Lot. 119(202), DAKO A/S, Denmark
- Mouse Immunoglobulins / biotinylated, Code No. E0464, Lot 079(301), DAKO A/S, Denmark
- Schweineserum: Swine Serum (normal), Code No. X0901, Lot 110(101), DAKO A/S, Denmark
- Glutaraldehyd Grade I: 50% Aqueous Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

#### 2.3.1.4 Ansätze

- TBS-Puffer für Immunhistologien 20fach:  
16 g Tris Base, 137 g Trizma Hydrochloride, 15,6 g Sodium Chloride auf 1L Aqua dest.
- Glutaraldehyd 3% in 0,1 molarem Phosphatpuffer für REM
- 0,1 molare Saccharoselösung in 0,1 molarem Phosphatpuffer für REM
- Osmiumtetroxyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer für REM

## 2.3.2 Methoden der Auswertungsverfahren

### 2.3.2.1 Einbettung der Präparate in Paraffin

Die in 4% Formalin fixierten Präparate wurden unter den Abzug gelegt. Das Nahtmaterial wurde, während die Präparate bis zur Weiterverarbeitung in 70% Ethanol feucht gehalten wurden, entfernt. Schließlich führten wir die Proben der Entwässerung, durch eine aufsteigenden Alkoholreihe im Autotechnikon, zu. Zur Dauer und Durchwanderung der einzelnen Schritte siehe Tabelle 2.

Tabelle 2

Schritt	Lösung	Dauer
1	Ethanol 70% I	1 Stunde
2	Ethanol 70% II	1 Stunde
3	Ethanol 80%	1 Stunde
4	Ethanol 96% I	1 Stunde
5	Ethanol 96% II	1 Stunde
6	Ethanol 100% I	1 Stunde
7	Ethanol 100% II	1 Stunde
8	Xylol I	1 Stunde
9	Xylol II	1 Stunde
10	Paraffin I	1 Stunde
11	Paraffin II	1 Stunde
12	Paraffin III	12-13 Stunden

Nach Durchwanderung im Autotechnikon wurden die Proben entnommen und in einen Topf mit erwärmtem Paraffin gelegt. Dort wurden sie entnommen, in eine Metallgußform gelegt, mit warmem Paraffin übergossen und auf einer Kälteplatte gekühlt. Das so mit den Proben erstarrte Paraffin wurde über Nacht in einem Kühlschrank bei 7°C gelagert und am nächsten Tag mit dem Schlittenmikrotom geschnitten. Für jedes Präparat wurden mehrere Schnitte

angefertigt: 5µm dicke Schnitte für die HE-, Toluidin-Blau und die Immunhistologie sowie 10 und 20 µm dicke Schnitte für die Polarisation.

### 2.3.2.2 Färbung der Schnitte

#### 2.3.2.2.1 Toluidin-Blau-Färbung

Dieser basische Farbstoff färbt saure Strukturen, also z.B. Glycosaminoglycane in verschiedenen Abstufungen von blau an. Manche Zellbestandteile verändern sich von blau zu rot. Der Farbwechsel wird als Metachromasie bezeichnet. Bei der Färbung von Knorpel kann man so die extrazelluläre Matrix identifizieren.

Nach Schneiden der Präparate wurden sie im Brutschrank für 30 Minuten fixiert.

Anschließend folgte die Entparaffinisierung der Schnitte für 15 Minuten mit Xylol und die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 3). Dann wurden die Präparate, nach Einstellung der Toluidin-Farbe auf pH 4,5 mittels 0,1% Salzsäure, 60 Minuten in der Toluidin-Farbe belassen. Danach durchliefen die einen dreimaliger Waschgang mit Aqua dest. und anschließend eine aufsteigende Alkoholreihe (Tabelle 4). Zuletzt wurden die Objektträger getrocknet und mittels eines Deckglases bestückt.

#### 2.3.2.2.2 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die meist benutzte Färbung in der Histologie und Routinepathologie. Der basische Farbstoff färbt basische Strukturen lila-blau. Auf der anderen Seite ist Eosin ein saurer Farbstoff der basische Strukturen rot oder rosa färbt. Allgemein kann man sagen, bei der HE-Färbung menschlicher oder tierischer Zellen sind die Zellkerne blau und das Zytoplasma rosa bis rot. Kollagenfasern werden rosa bis rot angefärbt.

Nach Schneiden der Präparate erfolgte die Fixierung derselben im Brutschrank für 30 Minuten. Anschließend erfolgte die Entparaffinisierung der Schnitte für 15 Minuten mit Xylol und die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe

(Tabelle 3). Dann wurden die Schnitte für 6 Minuten in Hämalaun belassen. Danach Spülung mit Leitungswasser für zwei Minuten, kurzes Eintauchen in HCL-Alkohol und Belassen der Schnitte für acht Minuten in frischem Leitungswasser. Es folgte eine erneute Spülung mit Aqua dest. und ein zweiminütiges Eintauchen in Eosin. Nach einer erneuten Spülung mit Aqua dest. wurden die Präparate der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt (Tabelle 4). Zuletzt wurden sie getrocknet und eingedeckelt.

Tabelle 3

Schritt	Lösung	Dauer
1	Ethanol 100%	2 Minuten
2	Ethanol 100%	2 Minuten
3	Ethanol 96%	2 Minuten
4	Ethanol 80%	2 Minuten
5	Ethanol 70%	2 Minuten
6	Ethanol 50%	2 Minuten
7	Aqua dest.	2-4 Minuten

Tabelle 4

Schritt	Lösung	Dauer
1	Ethanol 50%	3x eintauchen
2	Ethanol 70%	3x eintauchen
3	Ethanol 80%	3x eintauchen
4	Ethanol 96%	3x eintauchen
5	Ethanol 100%	5 Minuten
6	Ethanol 100%	3x eintauchen
7	Xylol I	2 Minuten
8	Xylol II	2 Minuten
9	Xylol III	2 Minuten

### 2.3.2.3 Bearbeitung der Präparate zur Immunhistologie

Die Immunhistologie dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Ausgegangen ist die Immunhistologie von der Beobachtung, daß der Organismus in der Lage ist, gegen körperfremde Proteine (Antigene) Antikörper zu bilden und daß die Antigene spezifisch durch Antikörper in einer Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden werden.

Dies wird in der Immunhistologie dadurch ausgenutzt, daß das zu untersuchende Material mit einer Lösung beschichtet wird, die einen Antikörper gegen das im Präparat vorhandene nachzuweisende Protein enthält. Der Antikörper stammt aus dem Serum eines Tieres, das vorher mit der im histologischen Präparat nachzuweisenden Substanz immunisiert („geimpft“) wurde. Dort hat die Substanz als Antigen gewirkt.

Um den bei der Antikörper-Antigen-Reaktion im Präparat neu entstandenen Komplex sichtbar zu machen können, wird der Antikörper vor seiner Verwendung mit einer histologisch nachweisbaren Markierung versehen.

Nach Schneiden der Paraffinblöcke wurden die Präparate auf spezielle Objektträger für Immunhistologien gelegt.

Zur Erwärmung des Paraffins sowie zur Fixierung der Präparate wurden die Schnitte für zwei Stunden im Brutschrank bei 60°C belassen. Anschließend erfolgte die Entparaffinisierung für 12 Minuten in Xylol und die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 3). Schließlich wurden die Objektträger in die Feuchtkammer gelegt, die überschüssige Flüssigkeit um die Präparate vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt und die Schnitte mit einem Fettstift (Abstand ca. 2-4 mm) eingekreist. Nun wurde die Schnitte mit Pepsin für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit Puffer gewaschen und für 10 Minuten darin belassen. Erneut wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig mit Zellstoff abgenommen.

Nun erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 1% Wasserstoffperoxid in Methanol für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach wurden die Präparate erneut mit Puffer gewaschen und 10 Minuten darin belassen. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig mit Zellstoff um die Präparate herum entfernt.

Als letzter Schritt wurde der primäre Antikörper Kollagen I oder II in einer Verdünnung von 1:200 auf die Schnitte getropft und bei 4°C über Nacht in der Feuchtkammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate als erstes mit Puffer gewaschen und 10 Minuten darin belassen.

Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Schnitte mit dem sekundärem biotinyliertem Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneutes Waschen mit Puffer und ein zehnminütiges Belassen der Schnitte darin.

Nachfolgend wurde die Flüssigkeit um die Präparate abgesaugt und Streptavidin (Avidin / biotinylierter Enzym Komplex) auf die Schnitte getropft und für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein erneutes Waschen mit Puffer und Belassen der Objektträger darin.

Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde nun Diaminobenzidin mit Wasserstoffperoxid (kommerzielle, fertige Chromogenlösung) hinzu gegeben und für sieben Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf Zellstoff dekantiert und die Objektträger kurz in Aqua dest. getaucht.

Dann erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (1:4 mit Aqua dest. verdünnt) für eine Minute und das „bläuen“ unter laufendem Leitungswasser für zehn Minuten.

Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 6) dehydriert und zuletzt wie normale Paraffinschnitte eingedeckelt.

Zwischen all diesen Schritten wurden die Präparate immer wieder in die Feuchtkammer gelegt. Auch wurden darin alle Inkubationen, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, durchgeführt.

#### 2.3.2.4 Bearbeitung der Präparate zur Polarisation

Bei der Polarisations-Mikroskopie wird zwischen Substanzen unterschieden, die einerseits Licht in allen Schwingungsebenen mit gleicher Geschwindigkeit hindurchtreten lassen und andererseits einen Lichtstrahl in zwei Strahlen zerlegen, deren Schwingungsebenen senkrecht zueinander stehen. Die

Aufteilung des Lichtes in zwei Strahlen verschiedener Schwingungsebenen bezeichnet man als Polarisation.

Licht, welches nur in einer Ebene schwingt, ist polarisiertes Licht. Substanzen oder Strukturen, die keinen Einfluß auf einen Lichtstrahl nehmen, nennt man isotrop oder einfachbrechend, solche, die einen Lichtstrahl zerlegen bzw. die Schwingungsebene eines Lichtstrahls drehen, doppelbrechend oder anisotrop. Die Untersuchung der Präparate im Polarisationsmikroskop erfolgt mit nur einachsig-schwingendem Licht. Erreicht wird dies dadurch, daß sich im Strahlengang des einfallenden Lichtes ein Polarisator befindet, d.h. ein optisches System, das Licht in einen ordentlichen und einen außerordentlichen Strahl zerlegt. Der ordentliche (Haupt-) Strahl wird durch totale Reflexion eliminiert, hindurchgelassen wird nur der außerordentliche Strahl.

Im Polarisations-Mikroskop sind Kollagenfasern einachsig doppelbrechend (anisotrop), dies weist auf ihren Aufbau aus langen, in Faserrichtung parallel verlaufenden Kollagenmolekülen hin. Die Doppelbrechung von Kollagenfasern ist veränderlich, zum Beispiel wird sie beim Trocknen und Erhitzen meist irreversibel gesenkt, bei Dehnung verstärkt. Doppelbrechung kann dazu benutzt werden, „maskierte“, d.h. in Grundsubstanz eingebettete Kollagenfasern polarisations-mikroskopisch sichtbar zu machen.

Zur Polarisations-Mikroskopie wurden 10 und 20 µm dicke Schnitte verwendet. Diese wurden nach Fixation der Präparate für 30 Minuten im Wärmeschrank mittels Xylol (2x10 Minuten) entparaffiniert und anschließend eingedeckelt. Ohne weitere spezielle Vorbehandlung wurden die Objektträger nach dem Trocknen unter ein Polarisations-Mikroskop gelegt.

#### 2.3.2.5 Bearbeitung der Präparate zur Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie dient der Abbildung von Oberflächen und der Darstellung der Ultrastruktur. Im Rasterelektronenmikroskop wird der Elektronenstrahl, bevor er auf das Objekt trifft, gebeugt und tastet dann in einer bestimmten Zeitfolge die Objektoberfläche Punkt für Punkt ab. Die Objektoberfläche wird vorher mit einer Schwermetallschicht, z.B. mit Gold bedeckt. Alle Punkte der Oberfläche imitieren dann zeitlich nacheinander

Sekundärelektronen. Diese werden durch einen Detektor aufgefangen, liefern einen Strom, der sich verstärken und zu einem Fernsehbild zusammensetzen läßt. Die Bilder sind außerordentlich plastisch und ermöglichen eine dreidimensionale Analyse von Oberflächen. Leider ist die Untersuchung lebenden Materials im Elektronenmikroskop nicht möglich, da alle zur Untersuchung gelangenden Präparate in das Hochvakuum des Elektronenmikroskops eingebracht werden müssen.

Die Fixation der Präparate erfolgte durch 3 % Glutaraldehyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer. Anschließend wurde das Fixans über 24 Stunden mittels 0,1 molarer Phosphatsaccharose entfernt. Es folgte die Osmierung der Präparate mit 1% Osmiumtetroxyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer.

Danach wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe in unvergälltem Alkohol (35%-50%-75%-96%-100%) entwässert. Schließlich erfolgte eine kritische Punkttrocknung mit CO<sub>2</sub>. Bevor die Präparate bereit zur Betrachtung durch das Elektronenmikroskop waren, wurden sie mit Leitsilber auf den Objektträger gelegt und mit Gold bespattert.

### **3. Ergebnisse**

Die Untersuchungen der Präparate wurde an allen 3 Gruppen vergleichbar durchgeführt. Nach Aufbereitung der jeweiligen Präparate wurden Histologien, rasterelektronenmikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen gefertigt, um festzustellen, in wie weit die Schnittfläche der einzelnen Präparate zusammengewachsen waren.

Die von uns angewendeten Färbemethoden zur Identifizierung von spezifischem Knorpelgewebe (Hyaliner-, Faserknorpel) werden als Standardfärbungen in der histologischen Auswertung von experimentellen Arbeiten im Rahmen der Knorpelforschung ubiquitär eingesetzt.

Zusätzlich wurden noch immunhistologische Nachweisverfahren angewendet, um eine qualitative Aussage über den defektüberbrückenden Knorpel treffen zu können.

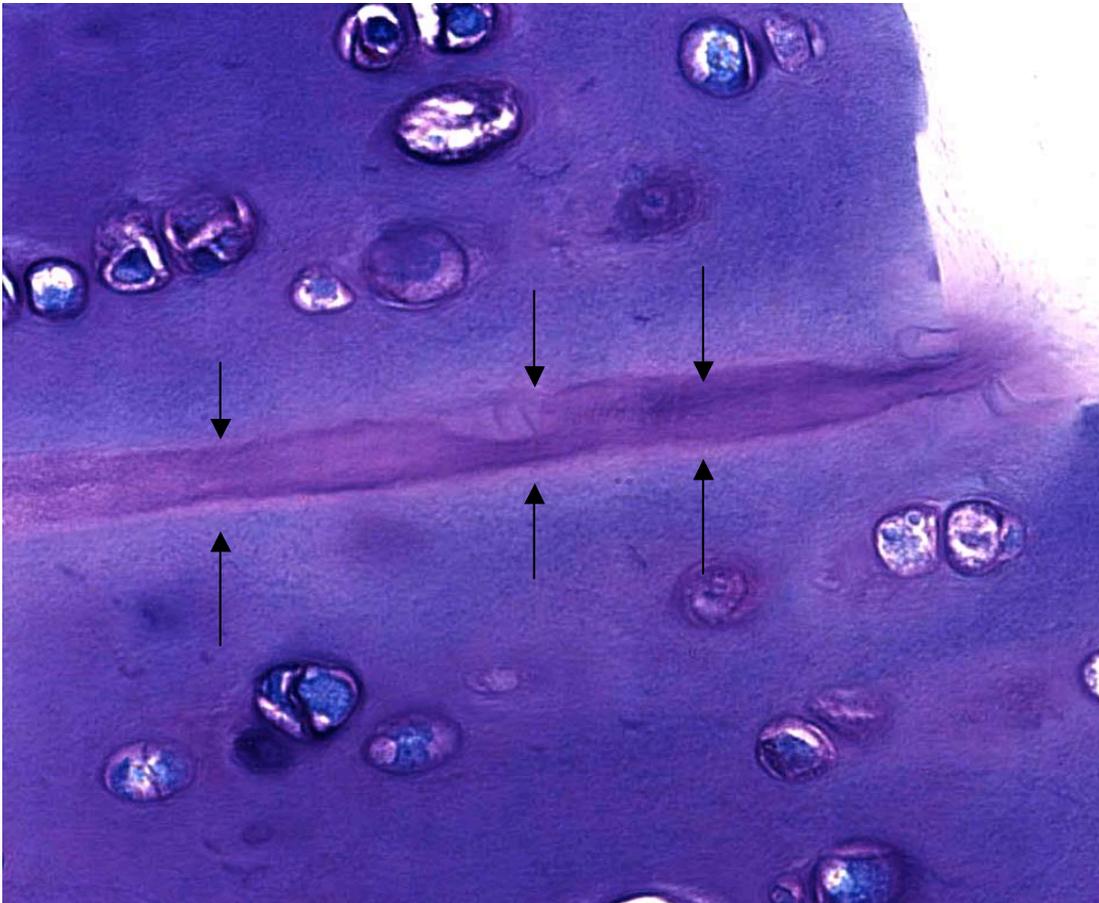
Es zeigte sich in allen Präparaten, in allen angewendeten Untersuchungs- und Nachweisverfahren eine Heilung der Schnittstellen in jeder der drei Versuchsreihen.

Der Kontakt zwischen beiden Geweben, der ex vivo-, der in vitro- und der Kombinationspräparate (Co-Kulturen), war im Bereich des ehemaligen Schnittes gleichmäßig und vollständig.

Immunhistologisch konnte in den ex vivo Präparaten Kollagen Typ II und in den in vitro Präparaten Kollagen Typ I sowie Typ II nachgewiesen werden.

### 3.1 Ergebnisse Gruppe 1: Heilungsverhalten von nativem Knorpel

#### 3.1.1 Toluidin-Blau-Färbung

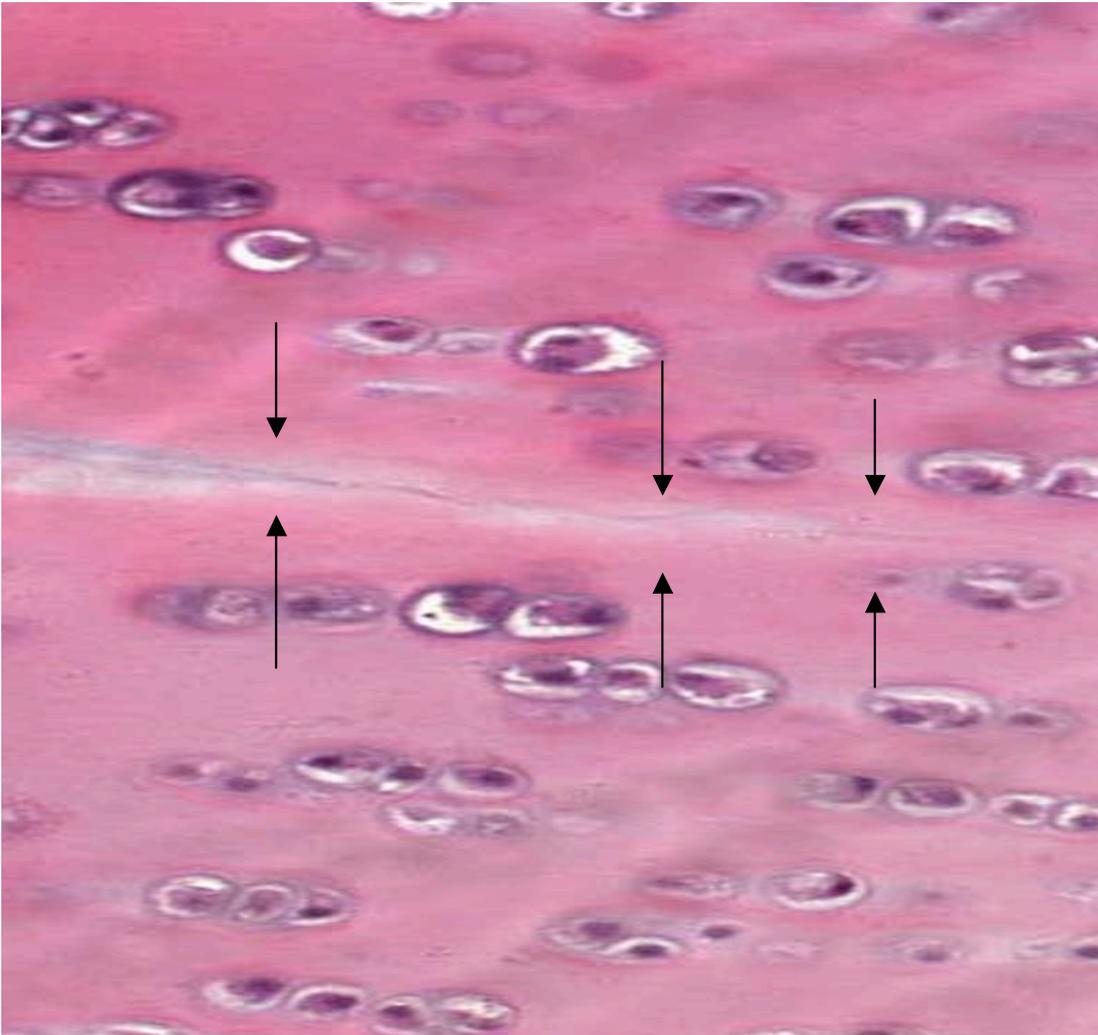


- Färbung mit Toluidin-Blau, 40fache Vergrößerung

Abb. 13: Präparat eines nativen Knorpelflakes, das nach Schnitt und Naht weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten wurde. Als Nährmedium wurde das beschriebene Medium zur Redifferenzierung verwendet.

In dieser Abbildung ist deutlich zu erkennen, daß es im Bereich des ehemaligen Schnittes des nativen Knorpels zu einer vollständigen und gleichmäßigen Überbrückung des gesetzten Defektes gekommen ist (Pfeile). Es zeigt sich keine Höhlenbildung und keine Demarkierung. Desweiteren lassen sich keine Matrixschäden feststellen.

### 3.1.2 HE-Färbung



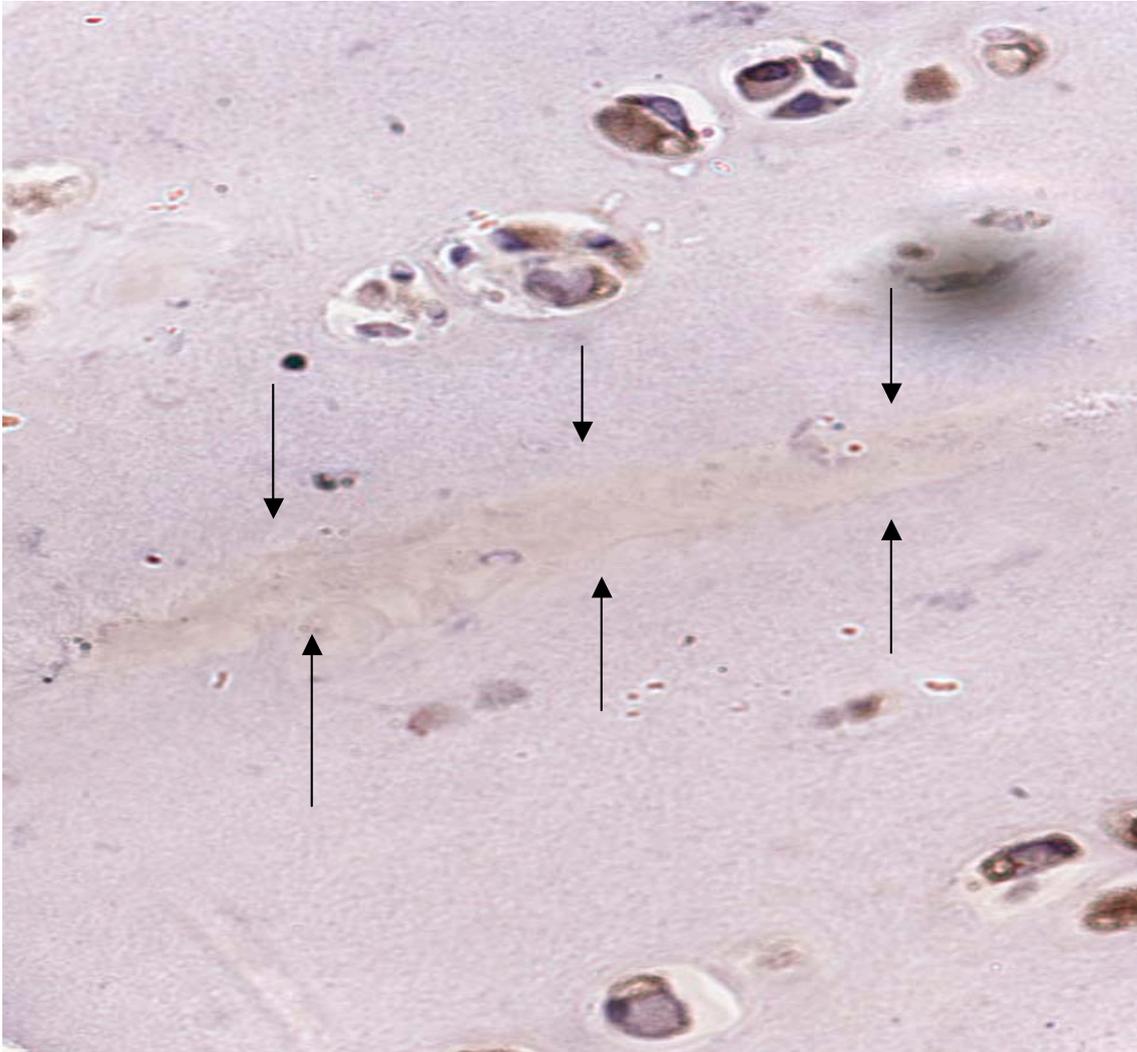
- HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

Abb. 14: Ehemaliger Schnittbereich nach 21 Tagen unter Kulturbedingungen eines nativen Knorpel-Präparates.

In dieser Abbildung kann man einen vollständigen Verschuß des ehemals gesetzten Defektes erkennen (Pfeile). Er stellt sich als heller angefärbte Zone dar. Am rechten Bildrand kann man Chondrozyten, die besonders nah am früheren Schnittbereich liegen, erkennen.

### 3.1.3 Immunhistologie

#### 3.1.3.1 Kollagen-I-Nachweisverfahren

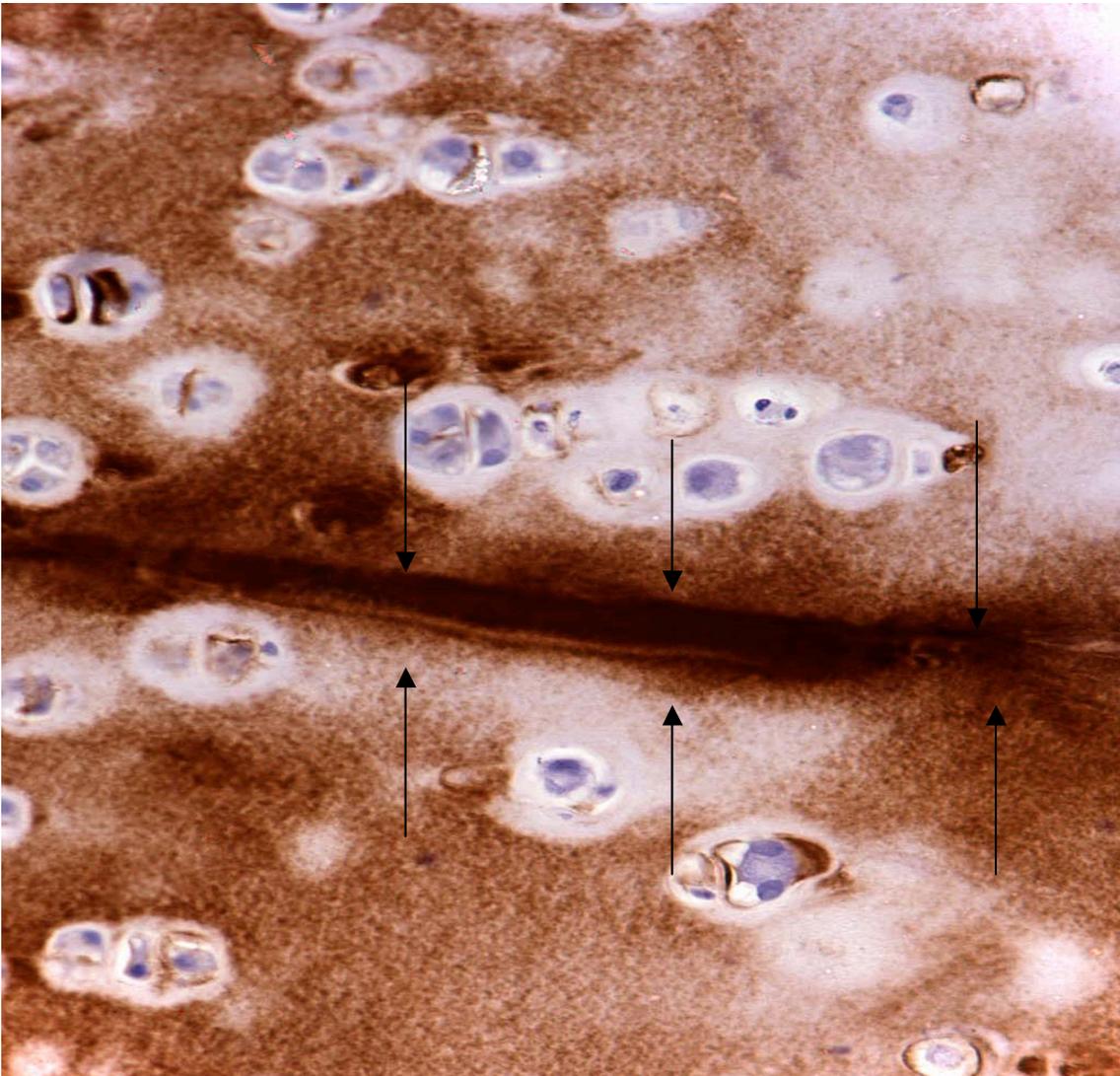


- Nachweisverfahren von Kollagen I in der Immunhistologie, 40fach vergrößert

Abb. 15: Präparat eines nativen Knorpelflakes, geschnitten, wieder zusammengenäht und 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten.

Man erkennt deutlich einen kompletten Verschluss des ehemaligen Schnittbereiches. An der fehlenden braunen Färbung erkennt man, daß weder im Bereich des nativen Knorpels noch im Schnittbereich Kollagen I vorhanden ist.

### 3.1.3.2 Kollagen-II-Nachweisverfahren

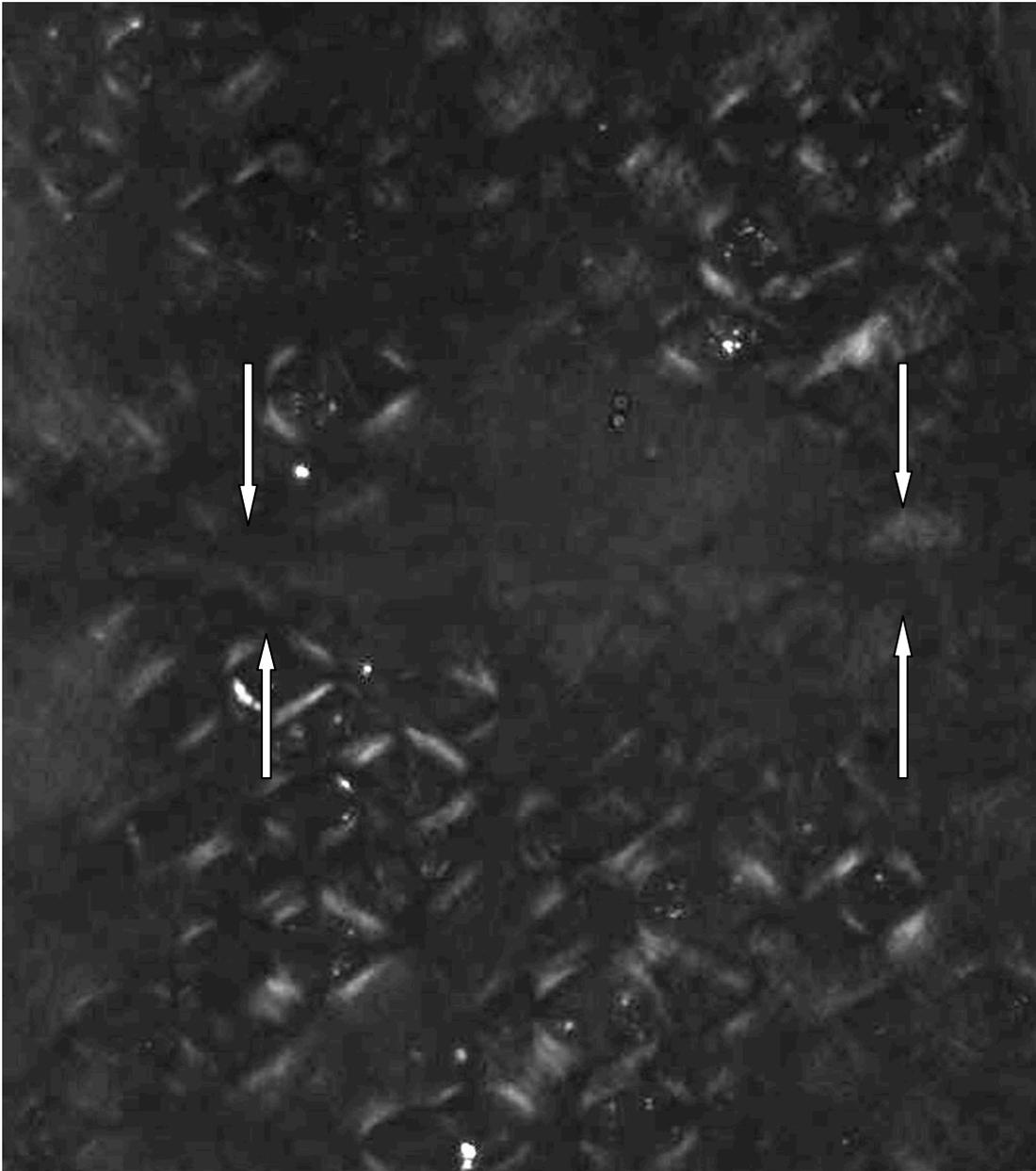


- Nachweisverfahren von Kollagen II in der Immunhistologie,  
40fach vergrößert

Abb. 16: Immunhistologischer Schnitt eines nativen Knorpel-Präparates nach Schnitt und Naht weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten.

Hier kann man sehr gut eine vollständige Überbrückung des ehemaligen Schnittbereiches (Pfeile) erkennen. Die braune Anfärbung, besonders ausgeprägt im Schnittbereich erkennbar, aber auch in der extrazellulären Matrix, weist auf die Anwesenheit von Kollagen II Fasern hin.

### 3.1.4 Polarisation



- Polarisations-Mikroskopie, 20fache Vergrößerung

Abb. 17: Polarisations-Mikroskopie eines geschnittenen und genähten nativen Knorpelflakes.

Man erkennt hier eine zarte Überbrückung des früheren Defektes (Pfeile) mit Fasern.

### 3.1.5 Rasterelektronenmikroskopie

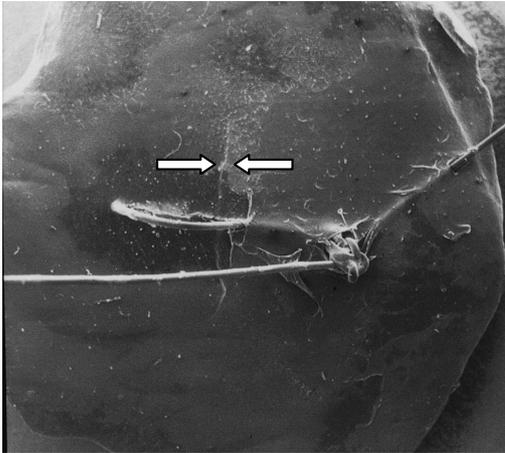


Abb. 18: REM 20fache Vergrößerung

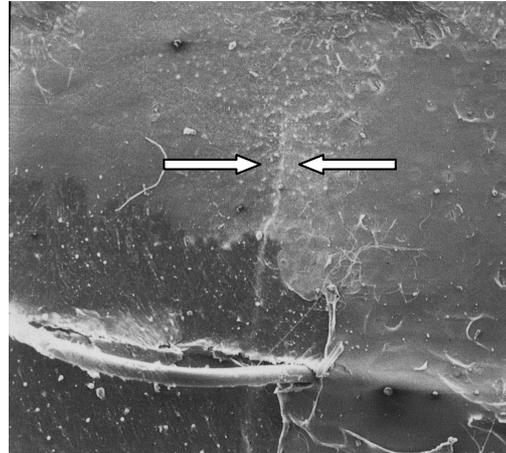


Abb. 19: REM 50fache Vergrößerung

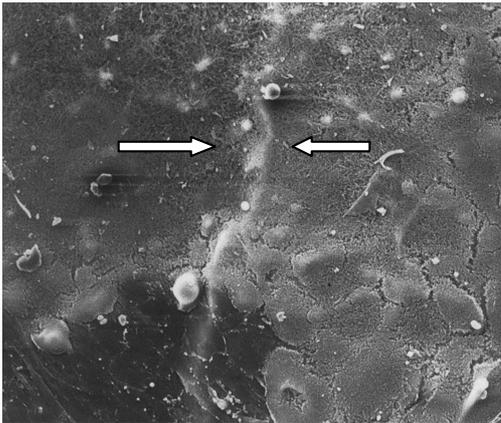


Abb. 20: REM 200fache Vergrößerung

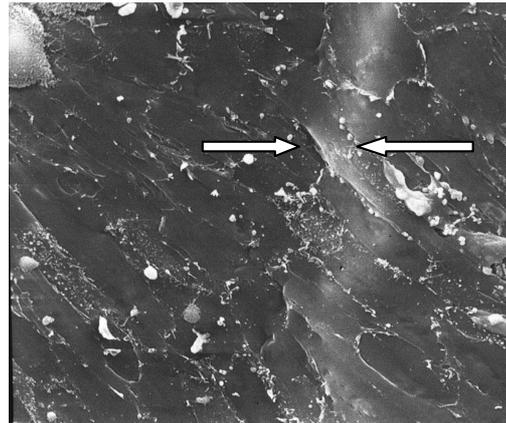


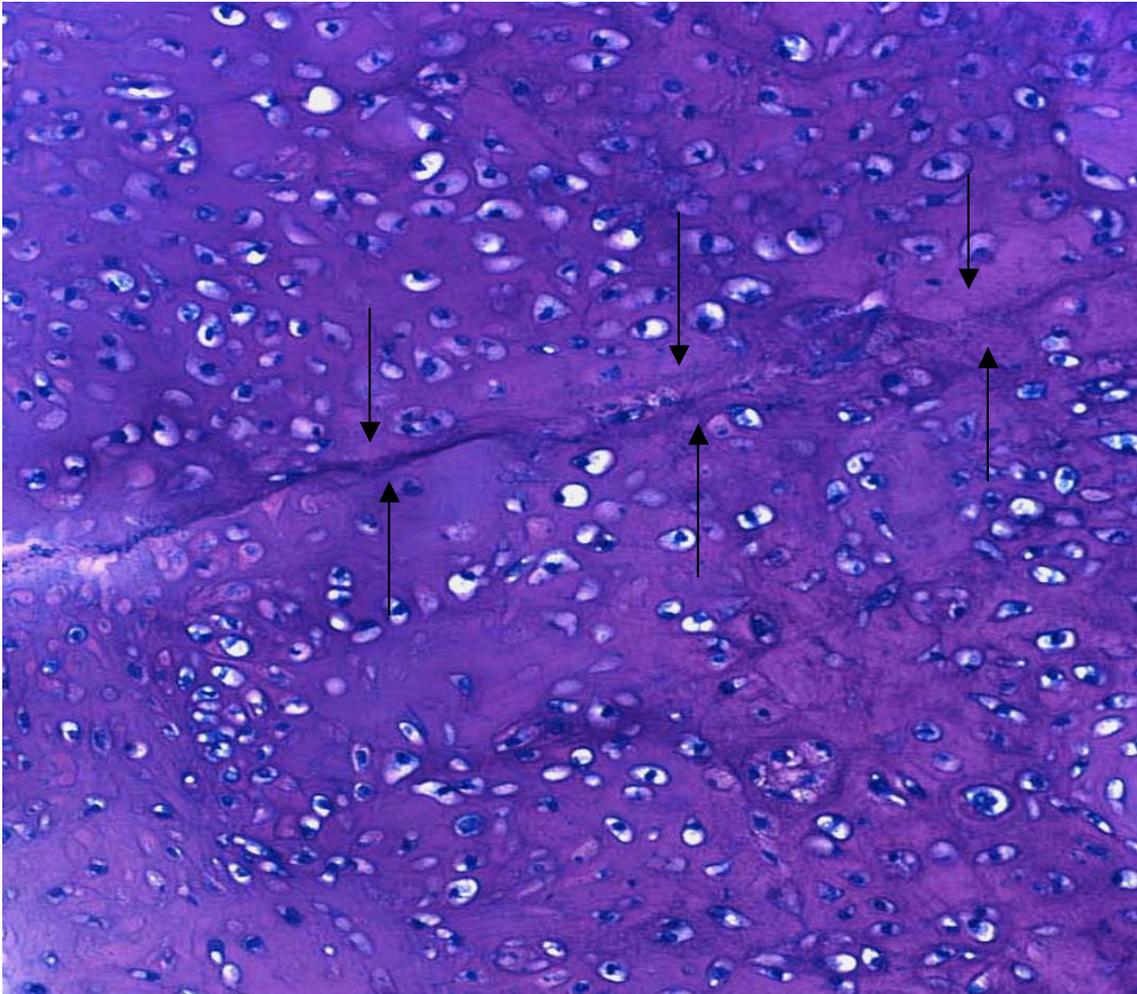
Abb. 21: REM 500fache Vergrößerung

Abb. 18-21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines nativen Knorpels.

Die Pfeilmarkierungen weisen auf den ehemaligen Schnittbereich hin, der sich als komplett verschlossen darstellt. Man kann Fasern erkennen, die gleichmäßig den früheren Defekt überbrücken.

## 3.2 Ergebnisse Gruppe 2: Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel

### 3.2.1 Toluidin-Blau-Färbung

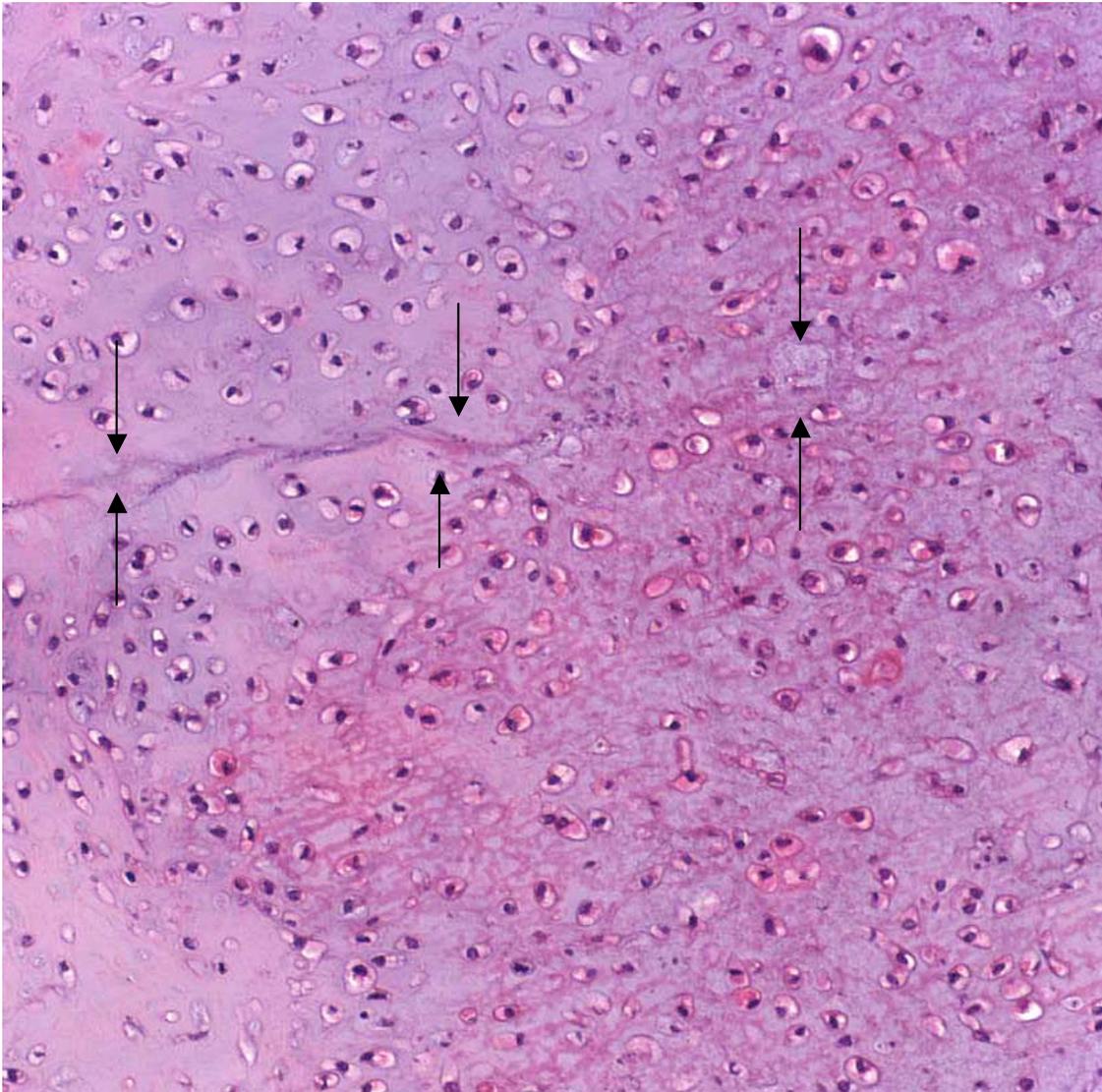


- Toluidin-Blau-Färbung, 25fache Vergrößerung

Abb. 22: Präparat eines in vitro hergestellten Knorpelpellets, in das nach erfolgter Redifferenzierung der Zellen ein Defekt gesetzt wurde und der nachfolgend wieder verschlossen wurde.

Nach weiteren 21 Tagen unter Kulturbedingungen kann man im vorliegenden Präparat eine vollständige Heilung des ehemaligen Schnittes (Pfeile) erkennen.

### 3.2.2 HE-Färbung



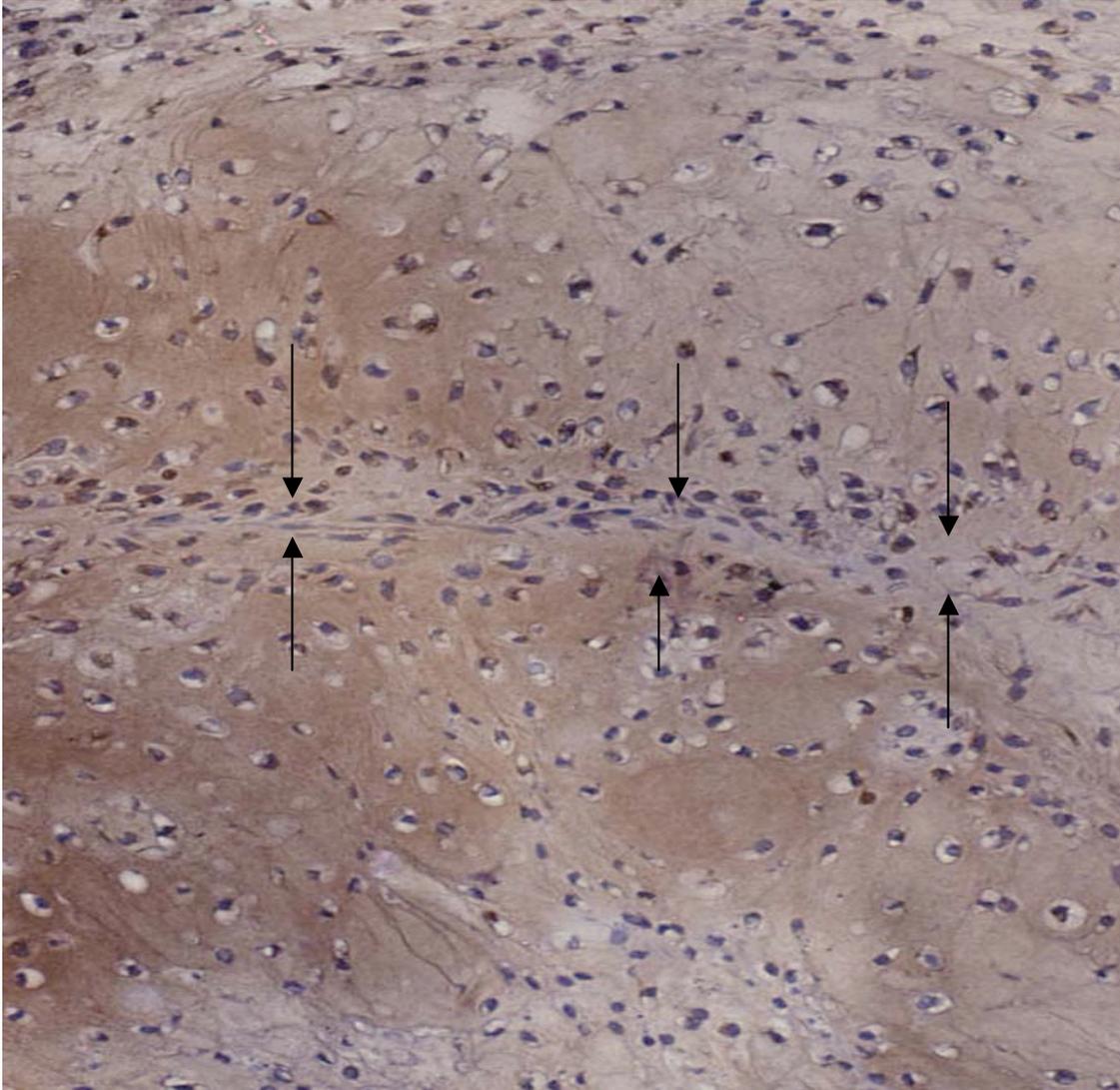
- HE-Färbung, 25fache Vergrößerung

Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines in Kultur gezüchteten Knorpel pellets, welches nach Redifferenzierung der Zellen zerschnitten, zusammengenäht und weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten wurde.

Im Bereich des ehemaligen Schnittkanals (Pfeilmarkierung) kann man eine vollständige Defektheilung mit einer Überbrückung durch Fasern erkennen.

### 3.2.3 Immunhistologie

#### 3.2.3.1 Kollagen-I-Nachweisverfahren

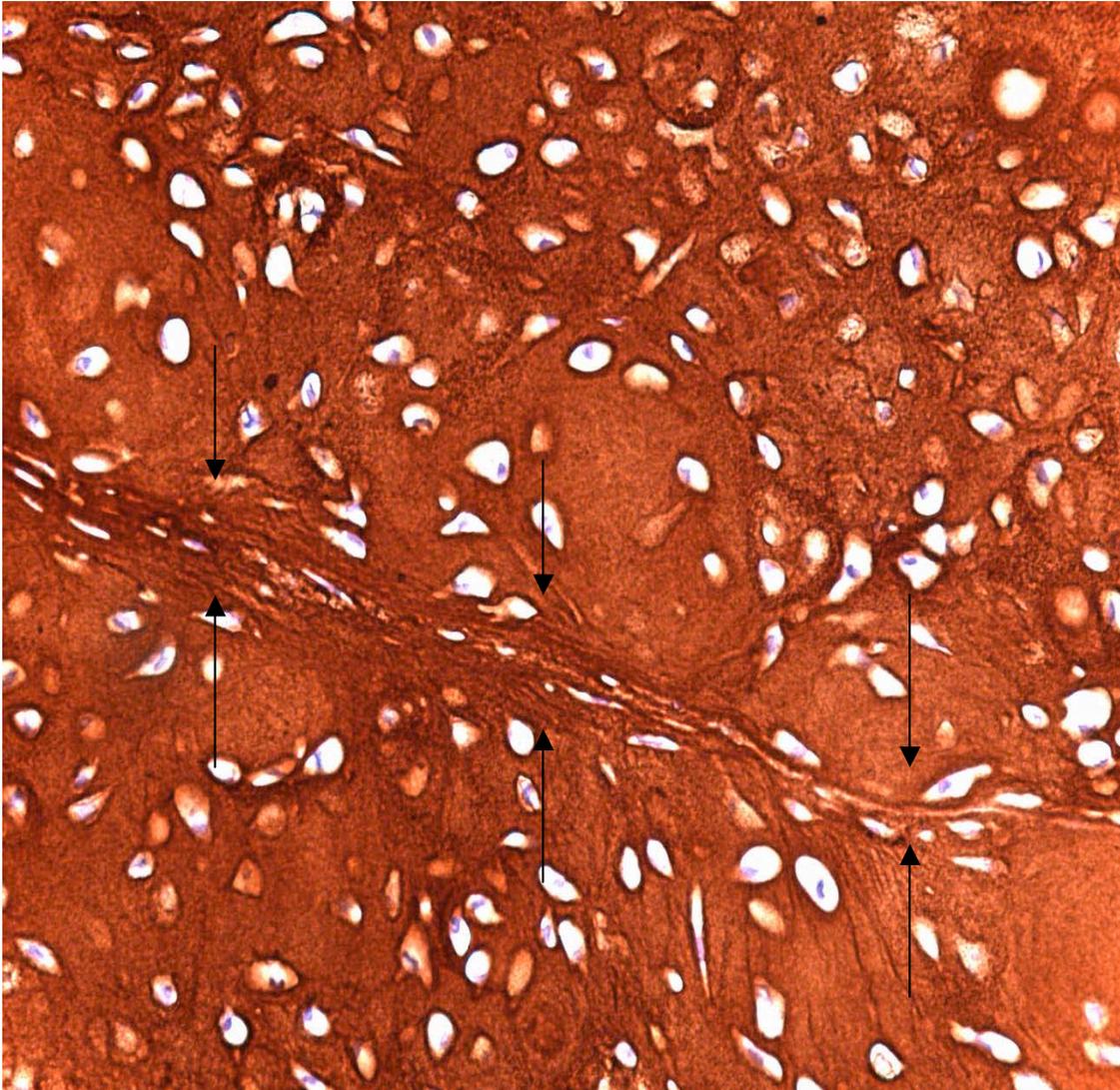


- Nachweisverfahren von Kollagen I in der Immunhistologie, 25fach vergrößert.

Abb. 24: Immunhistologisch aufbereitetes Präparat eines in Kultur gezüchteten Knorpelpellets, welches nach Redifferenzierung, Schnitt und Naht weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten wurde.

Im Bereich des ehemaligen Schnittbereiches sieht man eine vollständige Heilung und Überbrückung des früheren Defektes mit Fasern. Diese sind braun angefärbt und gehören somit zum Kollagenfaser-Typ I.

### 3.2.3.2 Kollagen-II-Nachweisverfahren



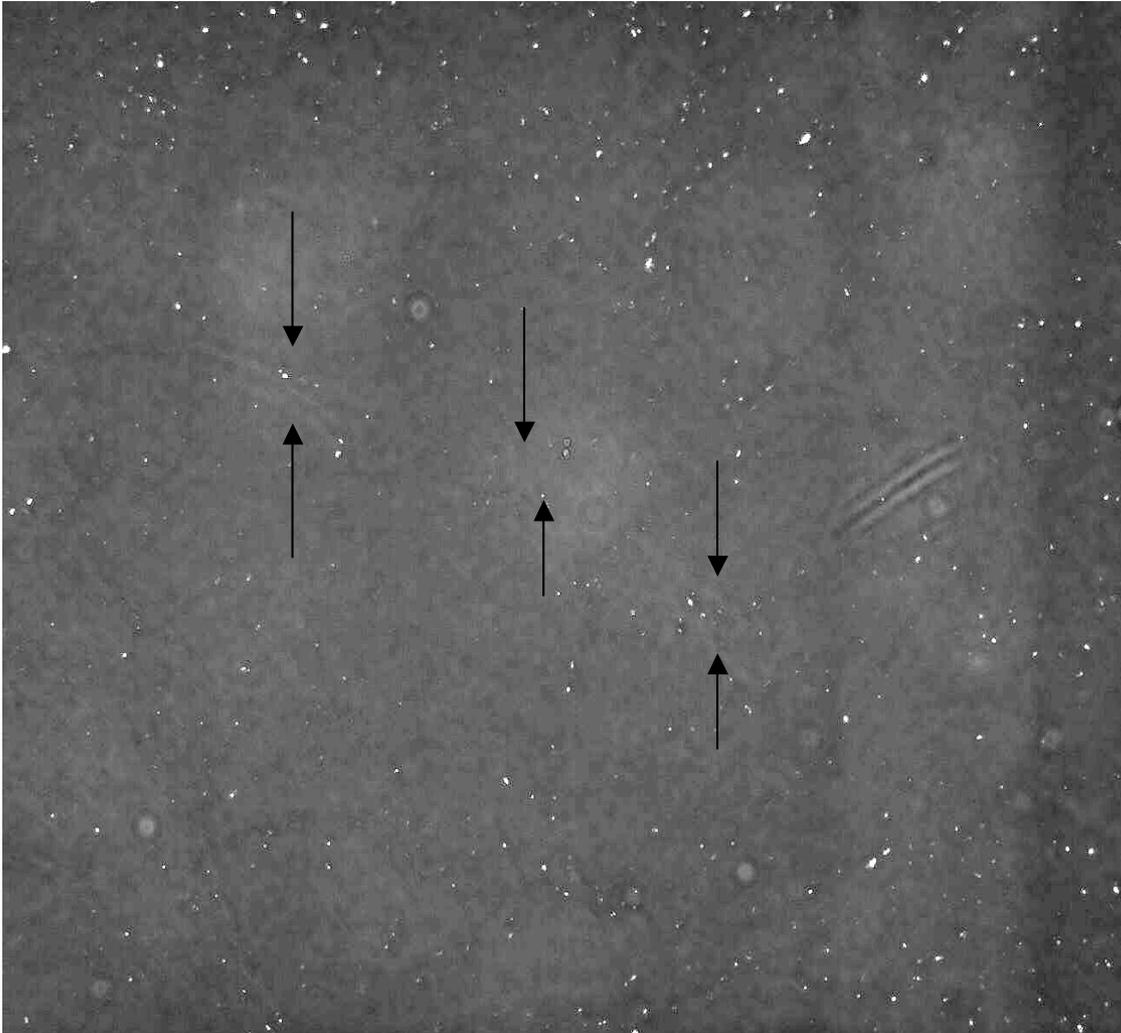
- Nachweisverfahren von Kollagen II in der Immunhistologie, 40fache Vergrößerung

Abb. 25: Nach dem immunhistologischen Verfahren angefärbtes, in vitro hergestelltes Knorpelpellet.

Nach Redifferenzierung der Zellen wurde ein Defekt gesetzt, wieder verschlossen und das Pellet weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten.

Der ehemalige Schnittbereich (Pfeilmarkierung) stellt sich als komplett mit Fasern durchzogen dar. Die braune Anfärbung weist auf das Vorhandensein von Kollagenfasern des Typs II hin.

### 3.2.4 Polarisation



- Polarisations-Mikroskopie, 10fache Vergrößerung

Abb. 26: Polarisationsmikroskopische Aufnahme eines in Kultur gezüchteten, nach Redifferenzierung geschnittenen und genähten Pellets.

Entnahme des Pellets nach 21 Tagen aus den Kulturbedingungen. Im früheren Schnittbereich (Pfeile) sieht man eine gleichmäßige Durchflechtung und somit Überbrückung mit Fasern.

### 3.2.5 Rasterelektronenmikroskopie

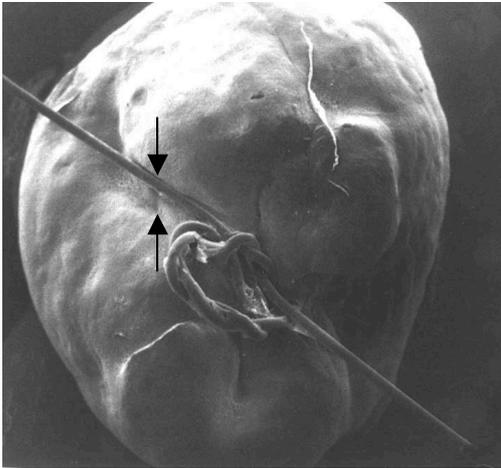


Abb. 27: REM 19fach vergrößert

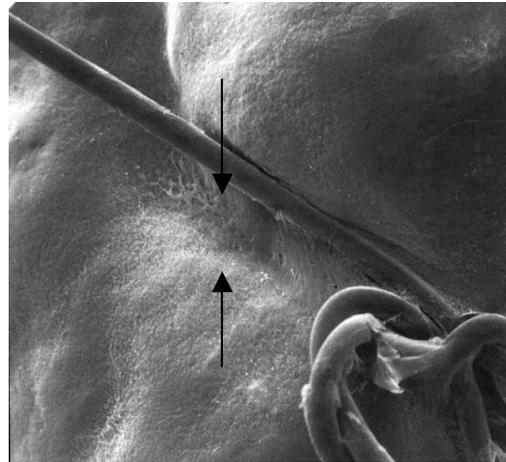


Abb. 28: REM 50fach vergrößert

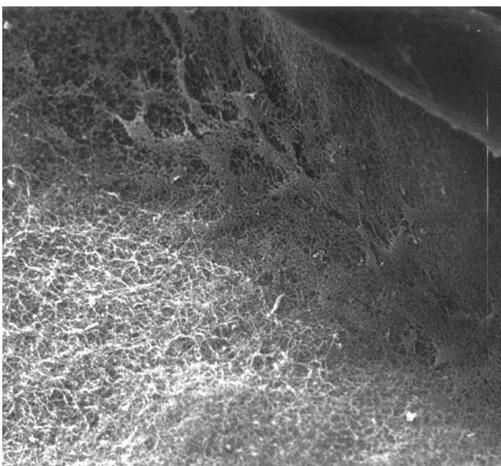


Abb. 29: REM 200fach vergrößert

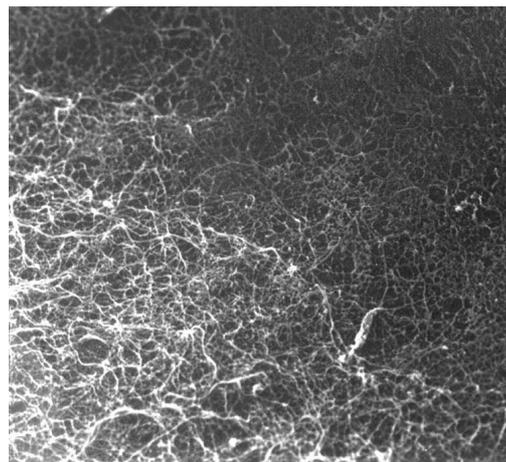
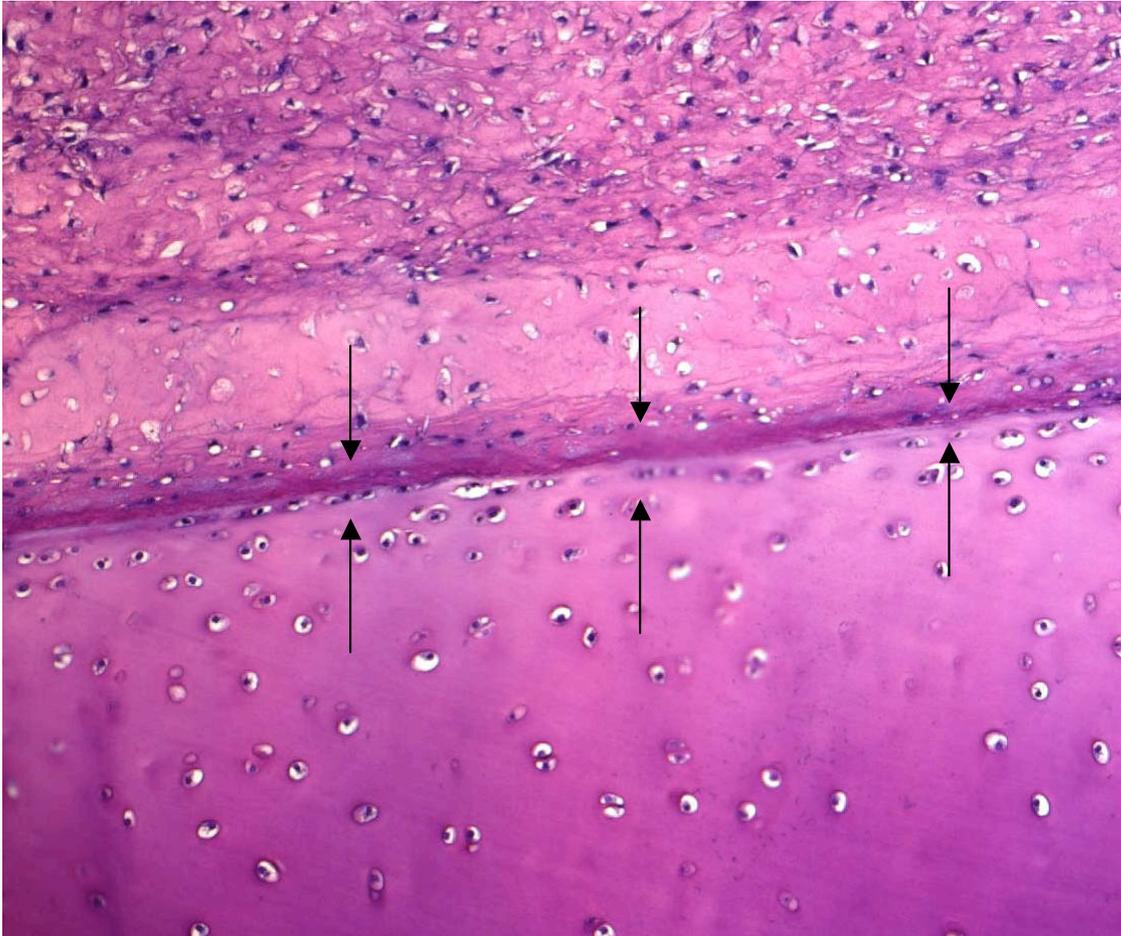


Abb. 30: REM 500fach vergrößert

Abb. 27-30: In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eines in vitro gezüchteten Knorpelpellets, welcher nach Redifferenzierung der Zellen, zerschnitten und genäht wurde, erkennt man deutlich eine komplette Verheilung der Schnittfläche (Pfeilmarkierung) sowie die Überbrückung derselben mittels Fasern. Letzteres wird vor allem in der 500fachen Vergrößerung deutlich.

### 3.3 Ergebnisse Gruppe 3: Heilungsverhalten von in Kultur gezüchtetem Knorpel in Kombination mit nativem Knorpel

#### 3.3.1 Toluidin-Blau-Färbung



- Toluidin-Blau-Färbung, 25fache Vergrößerung

Abb. 31: Abbildung eines Kombinationspräparates von nativem Knorpel mit in vitro hergestelltem Knorpel, welche geschnitten und zusammen genäht wurden.

Man erkennt deutlich das vollständige Verheilen des ehemaligen Schnittbereiches (Pfeilmarkierung) und das Überbrücken des Defektes mit Fasern. Nach dem Zusammenbringen weilte das Präparat für weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen. Im unteren Anteil erkennt man anhand des typischen Aussehens den hyalinen Knorpel, der obere Anteil stellt den in vitro hergestellten Knorpel dar.

### 3.3.2 HE-Färbung



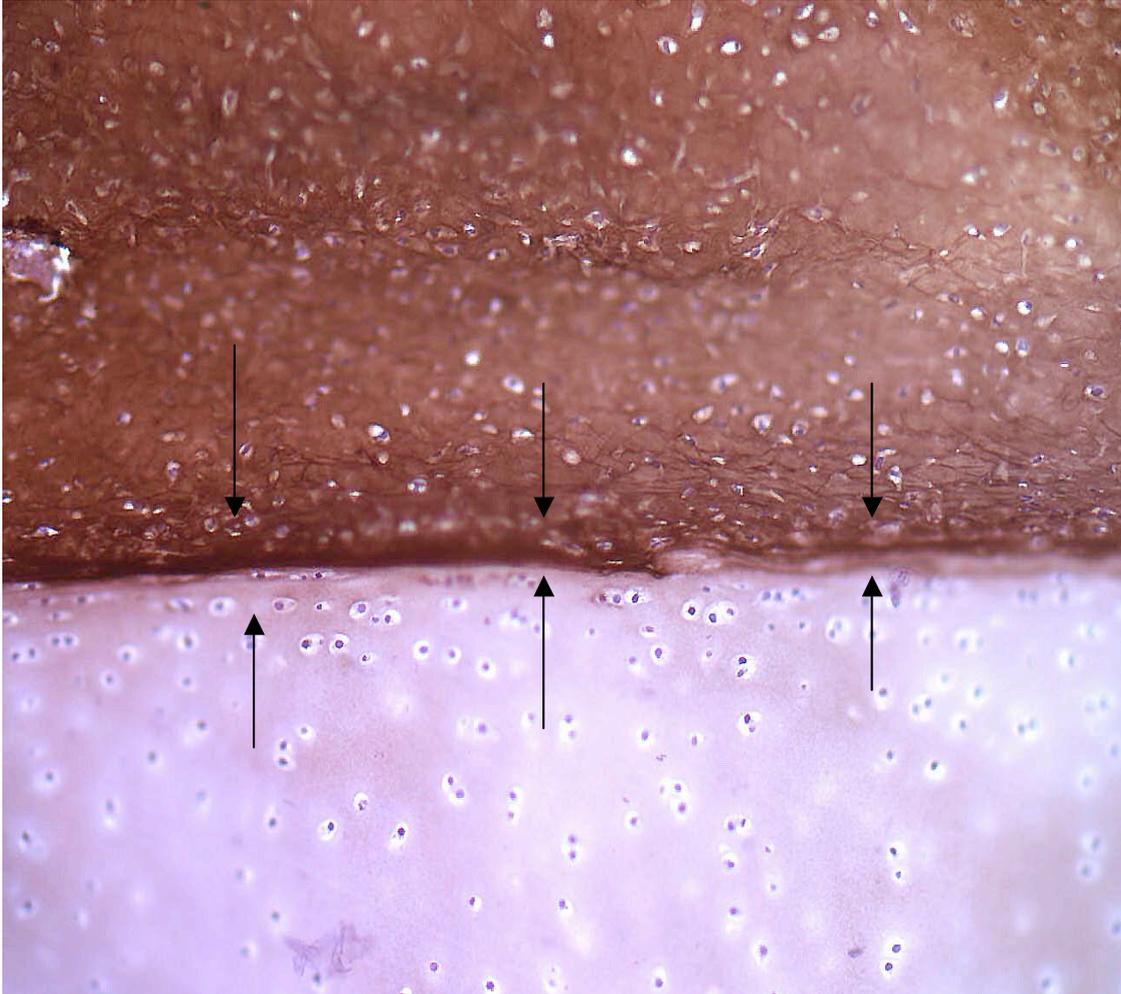
- HE-Färbung, 25fach vergrößert

Abb. 32: HE-Färbung eines Schnittes des Kombinationspräparates in vitro-ex vivo Knorpel.

Der in Kultur hergestellte Knorpel wurde nach Redifferenzierung mit dem nativen Knorpel vernäht und weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten. Im vorliegenden Präparat kann man das komplette Verheilen des ehemaligen Defektes erkennen. Der untere Anteil des Bildes wird von dem nativen Knorpel und der obere von dem in vitro hergestellten Knorpel gebildet.

### 3.3.3 Immunhistologie

#### 3.3.3.1 Kollagen-I-Nachweisverfahren

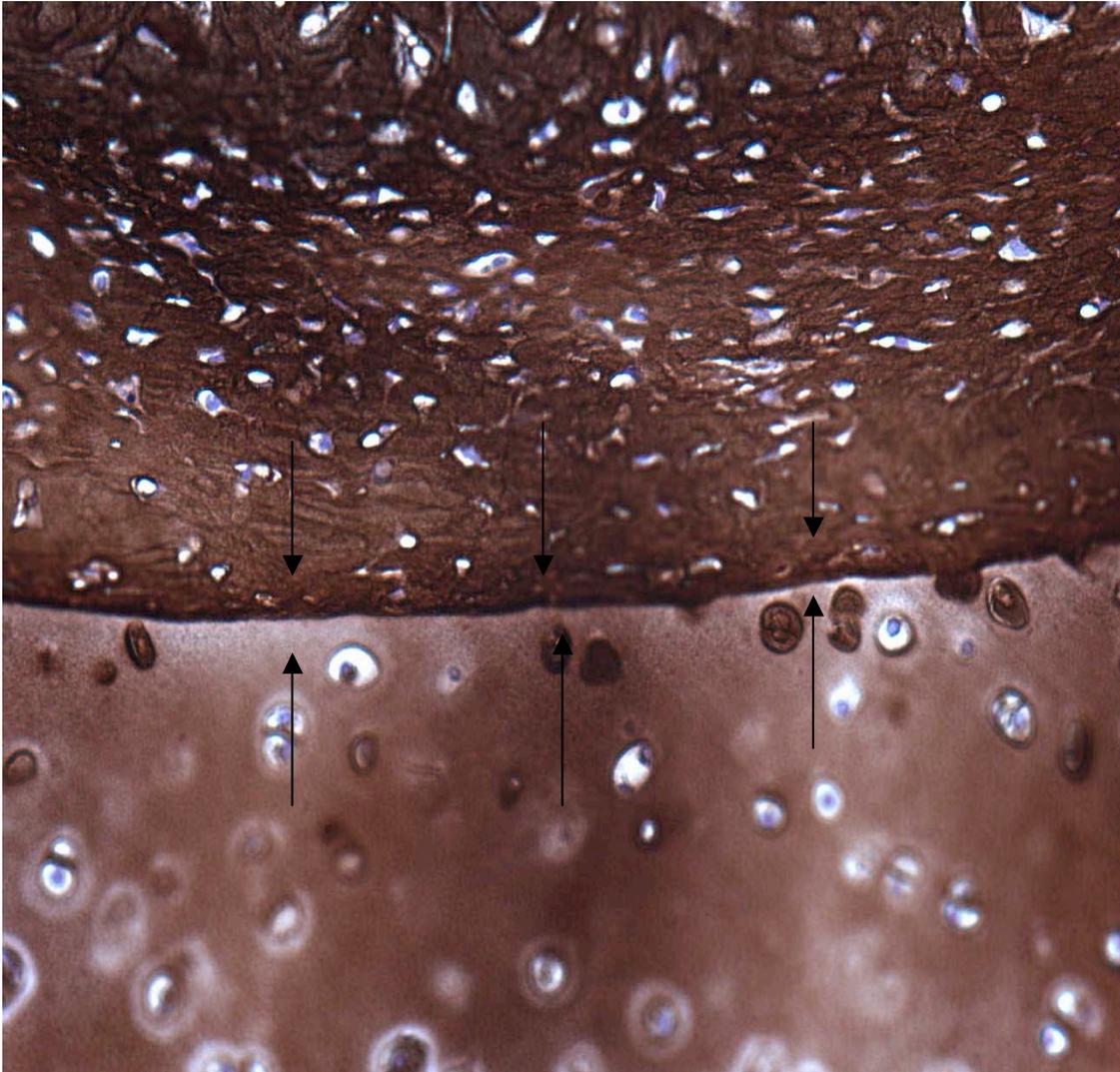


- Nachweisverfahren von Kollagen I in der Immunhistologie, 25fache Vergrößerung

Abb. 33: Immunhistologische Auswertung des Kombinationspräparates eines in vitro hergestellten Knorpels mit einem nativen Knorpelflake.

Man sieht ein komplettes Verheilen der ehemaligen Schnittstelle (Pfeile). Der untere Anteil wird von dem nativen Knorpel, der obere von dem in Kultur gezüchteten Knorpel eingenommen. Man erkennt eine deutliche braune Anfärbung des in vitro Knorpels, welches das Vorhandensein von Kollagen Typ I nachweist. Im Gegensatz dazu weist der native Knorpel keinerlei Anfärbung auf.

### 3.3.3.2 Kollagen-II-Nachweisverfahren

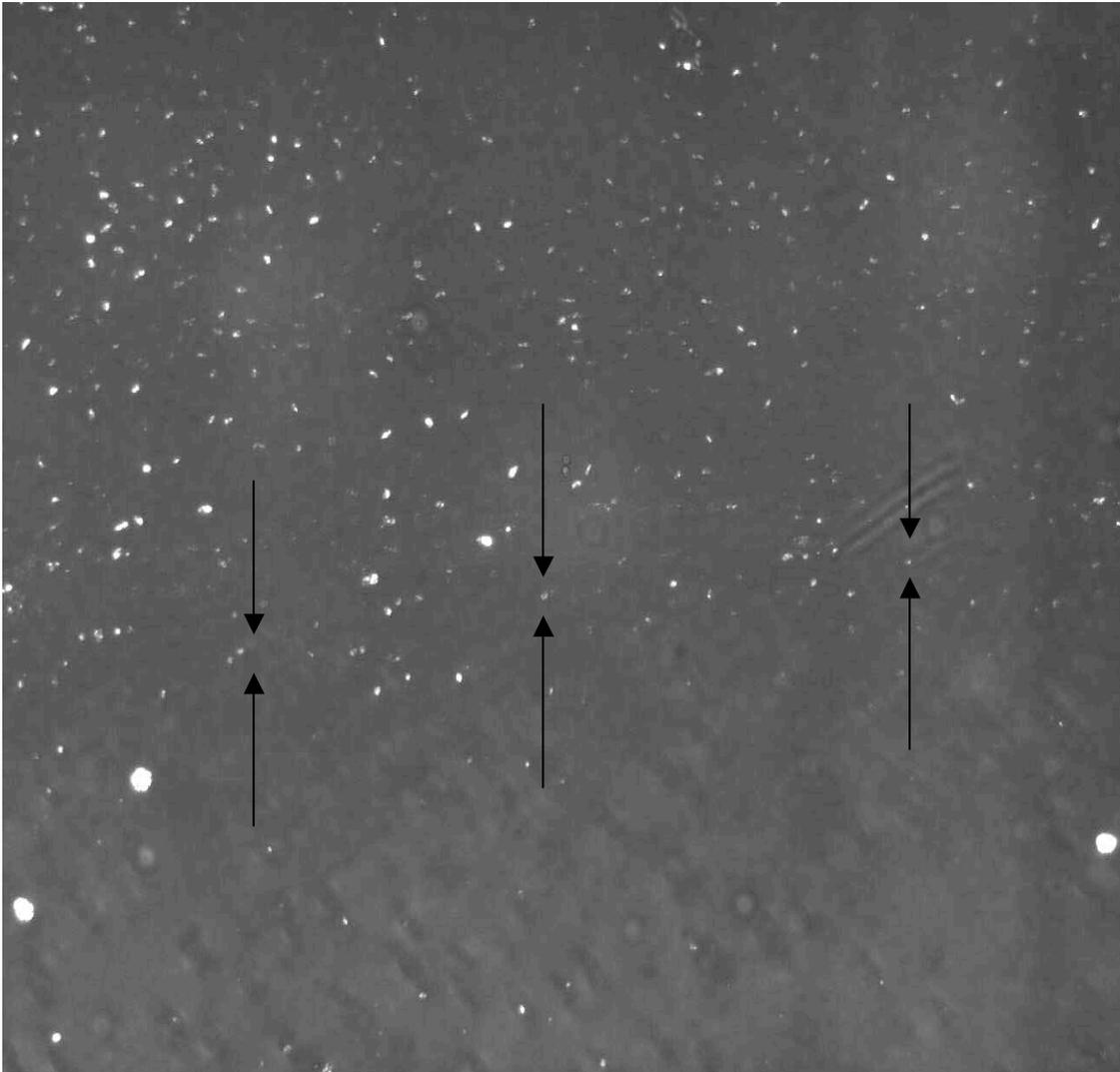


- Nachweisverfahren von Kollagen II in der Immunhistologie, 40fach vergrößert

Abb. 34: Kombinationspräparat von in vitro hergestelltem Knorpel mit nativem Knorpel.

Das in Kultur gezüchtete Pellet wurde nach Redifferenzierung mit dem entnommenen Knorpel vernäht und weitere 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten. Man erkennt in dem vorliegenden Bild deutlich das vollständige Verheilen der ehemaligen Schnittstelle (Pfeile). Der untere Anteil des Bildes besteht aus nativem Knorpel, der obere Anteil aus in vitro Knorpel. Beide Knorpelarten weisen eine deutliche Anfärbung auf, was den Nachweis von Kollagen Typ II erbringt.

### 3.3.4 Polarisation



- Polarisations-Mikroskopie, 10fache Vergrößerung

Abb. 35: Schnitt eines Kombinationspräparates von hergestelltem und nativem Knorpel.

Im vorliegenden Schnitt eines Kombinationspräparates, bei dem in vitro hergestellter Knorpel mit nativem Knorpel vernäht und anschließend 21 Tage unter Kulturbedingungen gehalten wurde, kann man einen vollständigen Defektverschluß (Pfeilmarkierung) bzw. eine komplette Defektüberbrückung mit Fasern erkennen. Der untere Anteil stellt den nativem Knorpel dar, der obere den in vitro hergestellten Knorpel.

### 3.3.5 Rasterelektronenmikroskopie

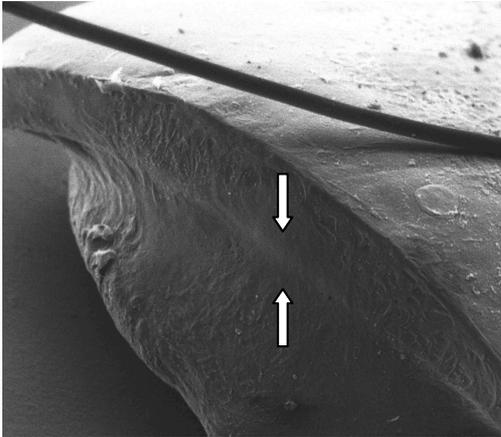


Abb. 36: REM 50fach vergrößert

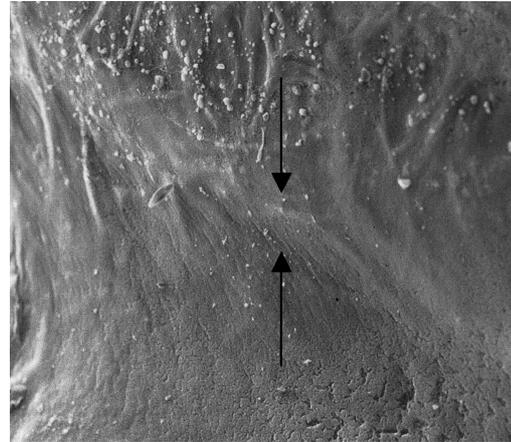


Abb. 37: REM 200fach vergrößert

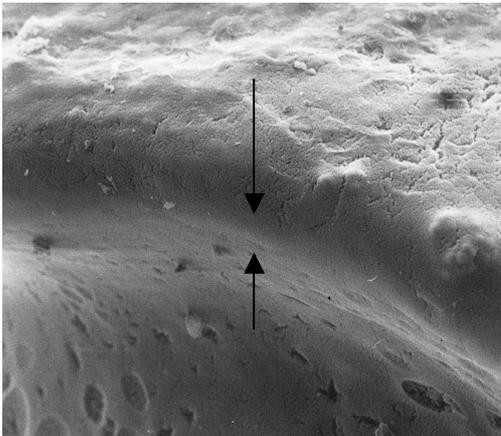


Abb. 38: REM 200fach vergrößert

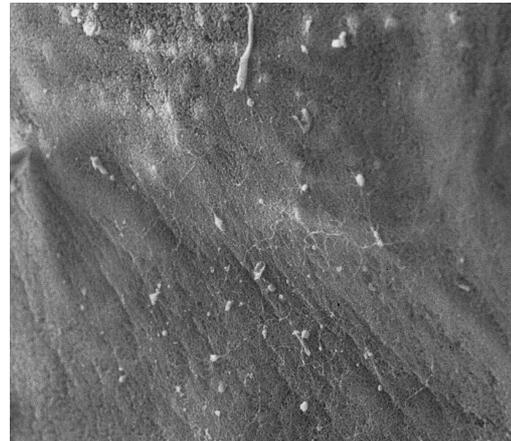


Abb. 39: REM 500fach vergrößert

Abb. 36-39: In den vorliegenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eines Kombinationspräparates von nativem Knorpel mit in vitro hergestelltem Knorpel kann man in der Übersichtsaufnahme deutlich das Zusammenheilen der beiden Knorpelarten auf der gesamten Länge des Schnittes erkennen (Pfeilmarkierung). Zusätzlich wird in den Vergrößerungen deutlich, daß der ehemalige Defekt durch Fasern vollständig überbrückt wird.

Der obere Anteil des Präparates wird von nativem, der untere Anteil von in vitro kultiviertem Knorpel eingenommen.

## **4      Diskussion**

Unser Ergebnis besagt, daß nativer Knorpel unter Kulturbedingungen heilt. Warum dies in vivo nicht geschieht, sollte in weiteren experimentellen Studien untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre die detaillierte Aufschlüsselung der Synovialflüssigkeit. Hierbei könnte herausgefunden werden, welche Komponenten das Heilungsverhalten von Knorpel fördern, welche es negativ beeinflussen und wie man diese Effekte unterdrücken bzw. unterstützen kann.

Die fehlende Spontanheilung von hyalinem Gelenkknorpel ist das Kernproblem bei Patienten mit einer traumatisch oder degenerativ bedingten Knorpelschädigung [PAP, 1961; CALANDRUCCIO, 1962; FURUKAWA, 1980; HANGODY, 1997; NEWMAN, 1998; O`DRISCOLL, 1998; GRANDE, 1999; HUNZIKER, 1999; CHEN, 1999].

Da immer mehr junge Menschen einen Knorpelschaden erleiden [SPINDLER, 1993; SCHIEBER, 1994; HILGERT, 1996; DE LOES, 2000; WEISE, 2000], gewinnt das Verständnis der Knorpelheilung zunehmend an Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es daher eine grundsätzliche Aussage darüber zu treffen, ob natives Knorpelgewebe in Gewebekultur die Kapazität besitzt, nach dem Setzen eines Defektes wieder zusammenzuheilen und ob dies auch für in Kultur gezüchteten Knorpel gilt.

Zusätzlich wurde die Frage, ob diese beiden verschiedenen Knorpelarten unter Kulturbedingungen die Fähigkeit haben, miteinander großflächig zu verwachsen, bearbeitet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die weitere Entwicklung von Therapiemodellen von Bedeutung [GRANDE, 1987; GRANDE 1989; BRITTBERG, 1994, BRITTBERG, 1996; PETERSON, 2000].

Zur Beantwortung der Frage, ob Knorpelgewebe prinzipiell unter den Bedingungen der Gewebekultur heilt, wurden in dieser Arbeit drei Versuchsreihen durchgeführt:

Zunächst wurde untersucht, ob nativer Knorpel, am Stück aus dem Gelenk entnommen, nach Inzision und Zusammennähen unter den Bedingungen der Zellkultur heilt. Dazu wurden die genähten Knorpelflakes in mit fetalem

Kälberserum und Wachstumsfaktoren angereichertem Medium für 21 Tage kultiviert. Hier konnte mit den angewendeten Nachweisverfahren gezeigt werden, daß es zu einem flächigen und vollständigen Verheilen der gesamten Schnittfläche gekommen war.

In der Immunhistologie zeigte sich im ehemaligen Schnittbereich das, für hyalinen Knorpel typische Kollagen Typ II und nicht, wie im Faserknorpel üblich, Kollagen Typ I. Somit konnte gezeigt werden, daß nativer Knorpel in der Zellkultur mit den Defekt überbrückenden Kollagen Typ II Fasern verheilt.

Im zweiten Schritt wurden Knorpelzellen, isoliert aus einem Knorpelflake, in der Zellkultur proliferiert. Schließlich wurden sie in einem 3D-Verfahren in Alginate-Beads zur Redifferenzierung für zwei Wochen eingebettet. Nach erfolgter Redifferenzierung wurden die so entstandenen Pellets mittels eines Skalpell geteilt und nachfolgend wieder aneinander genäht. Der Nachweis eines auch hier stattfindenden flächigen und kompletten Zusammenwachsens erfolgte durch die angewendeten histologischen Untersuchungen.

In den immunhistologischen Auswertungen zeigte sich im ehemaligen Schnittbereich sowohl die Anwesenheit von Kollagen Typ I als auch von Kollagen Typ II.

Bei der dritten Versuchsreihe, dem ex vivo/in vitro Kombinationsversuch, wurde die Situation, die im Rahmen einer von uns experimentell konstruierten Defektauffüllung mit autogenem Transplantat entsteht, nachgestellt. Knorpelgewebe wurde aus dem Knie- bzw. Ellenbogengelenk eines Mini-Pigs entnommen. Die extrazelluläre Matrix wurde verdaut und die Chondrozyten isoliert. In Zellkultur wurden die Zellen vermehrt und schließlich bei ausreichender Zellzahl in Alginate-Beads für 14 Tage redifferenziert. Anschließend wurden die Chondrozyten mitsamt der gebildeten extrazellulären Matrix aus dem Alginate gelöst und zu Pellets weiter verarbeitet. Nun wurde aus demselben Tier, welches den Knorpel für die Zellkultur geliefert hatte, Knorpel gewonnen und mit dem Pellet vernäht. Diese Verbindung wurde 21 Tage unter Zellkultur-Bedingungen gehalten.

Auch hier zeigte sich in den verwendeten Analyseverfahren ein flächiges und komplettes Zusammenwachsen der unterschiedlichen Gewebearten. Somit

konnten wir beweisen, daß zur autologen Knorpeltransplantation in vitro produzierter Knorpel mit dem umliegenden Gelenkknorpel in der Zellkultur zusammenwächst.

So kann festgestellt werden, daß eine Kapazität zur Heilung von kultiviertem Knorpel mit nativem Gelenkknorpel, ebenso wie das Vorhandensein der Heilungskapazität von nativem Knorpel in der Zellkultur besteht. Die Festigung dieser These war Kernbestand dieser Arbeit.

Nun muß jedoch konstatiert werden, daß die Heilung des Gewebes unter Bedingungen der Zellkultur stattfand und es resultiert die Frage, warum diese Eigenschaft nicht im Gelenk fortbesteht.

Einerseits zeigt sich der normale Heilungsvorgang von Gewebe mit Einwachsen von Gefäßen, Zell-Migration und Entzündungsreaktionen nur ansatzweise in Knorpeldefekten, die bis in den subchondralen Knochen reichen [MEACHIM, 1971; COLETTI, 1972; HURTIG, 1988; CHEN, 1992; SHAPIRO, 1993], jedoch nicht in oberflächlichen Knorpelverletzungen [GHADIALLY, 1977; MANKIN, 1982; BUCKWALTER, 1988; CHEN, 1992]. Dies läßt sich durch die Abwesenheit von Blutgefäßen im Knorpel erklären [MANKIN, 1974; MANKIN, 1982; SILVER, 1991].

Allerdings widerspricht das unseren Ergebnissen, die gezeigt haben, daß nativer Knorpel auch ohne Anwesenheit von Blutgefäßen, nämlich in der Zellkultur, heilen kann.

So stellt sich nun eine weitere Frage: wird eventuell die Heilungskapazität von nativem Knorpel durch das Fehlen von Synovialflüssigkeit in der Zellkultur positiv beeinflusst, da Gelenkknorpel alle Nährstoffe in vivo durch Diffusion aus der Gelenkflüssigkeit erhält? Gesucht werden demnach Substanzen in der Synovialflüssigkeit, die die Heilung von geschädigtem Knorpel negativ beeinflussen oder sogar vollständig unterdrücken.

Eine Studie von Lee et. al. zeigte, daß Chondrozyten, die in Synovialflüssigkeit kultiviert wurden, eine deutlich niedrigere Teilungsrate aufwiesen als Zellen, die

in Medium, angereichert mit fetalem Kälberserum, gehalten wurden [LEE, 1997].

Dies deutet auf das Vorhandensein von Komponenten hin, die das Wachstum der Chondrozyten unterdrücken. Als Beispiel hierfür sind Fibronektin-Fragmente zu nennen, die auf Chondrozyten-Kulturen gegeben, zu einer Schädigung der Zellen führten [HOMANDBERG, 1998]. Fibronektin findet sich in normaler Gelenkflüssigkeit, Fibronektin-Fragmente werden insbesondere in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis gefunden. Auch liegen Erkenntnisse vor, daß neutrophile Elastase-Komplexe in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden, zu einer Zerstörung von Knorpelmatrix in vitro führt [MOORE, 1999]. Es befinden sich demnach in der menschlichen Synovialflüssigkeit Matrixabbauende Proteinase und deren Inhibitoren. Außerdem gibt es in der Synovialflüssigkeit Mediatoren, die die Knorpelmatrix-Synthese hemmen (z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ ) und matrixabbauende Proteinase. Deren Wirkung wiederum kann jedoch von Antagonisten, Inhibitoren und löslichen Rezeptoren moduliert werden.

Neidel [NEIDEL, 2000] versuchte herauszufinden, wie bedeutend die Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit für die Prognose der Matrixsynthese der Chondrozyten ist. Dazu untersuchte er die Synovialflüssigkeit von 115 Patienten mit verschiedenen Kniegelenkserkrankungen (Gonarthrose, Meniskusverletzung, rheumatoide Arthritis, reaktive Arthritiden) auf verschiedene Parameter (Interleukin-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-1-RA, TNF- $\alpha$ , IGF-I, IGF-II, IGF-Bindungsprotein-2, IGFBP-3). Zusätzlich wurde noch die Gesamtaktivität von Proteinase bzw. Kollagenase bestimmt. Zur Bestimmung des Effekts der einzelnen Proben von Synovialflüssigkeit auf die Matrixsynthese artikulärer Chondrozyten wurde boviner Gelenkknorpel in Anwesenheit von Synovialflüssigkeit inkubiert und anschließend die Proteoglykan-Syntheserate bestimmt.

Dabei fand er heraus, daß die Synovialflüssigkeit von Patienten mit traumatischen und arthrotischen Kniegelenksveränderungen die Proteoglykansynthese mehr stimulierte, als die Synovialflüssigkeit der Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Auch andere Studien belegten, daß sich die Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit im Falle einer Schädigung des Gelenkes, abhängig von der Art der Schädigung verändert [BELLO, 1997; HOMANDBERG, 1998; FULLER, 2001]. Zum Beispiel müssen als sekundäre Schädigungsfaktoren für die Heilung von Knorpel, bei bereits gestörter Integrität der Gelenkoberfläche, eindringende Komponenten der Gelenkflüssigkeit (Makromoleküle und Zytokine: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , PG E2) gesehen werden. Nur bei spezifischer Proteoglycan- und Kollagenproduktion genügt das Gewebe den biomechanischen Anforderungen [MAIOTTI, 2000].

Den besten Vorhersagewert für die Effekte einer Synovialflüssigkeits-Probe auf die Proteoglykansynthese hatte dabei der Anteil an freiem IGF-I, gefolgt von der IGF-I-Konzentration sowie den Konzentrationen von IGFBP-3, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Keinen ersichtlichen Einfluß hatte das Alter der Patienten.

Somit können niedrige Spiegel an freiem IGF-I in der Synovialflüssigkeit als möglicher Risikofaktor für eine suboptimale Proteoglykansynthese von Chondrozyten, ortsständig oder transplantiert, die diesem synovialen Milieu ausgesetzt sind, angesehen werden.

Deshalb ist davon auszugehen, daß sich pathologische Zustände, die mit einer niedrigen Konzentration an freiem IGF-I im Gelenk einhergehen, negative Auswirkungen auf das Heilungsverhalten von nativem Knorpel und somit auch auf den Erfolg einer Chondrozytentransplantation haben. Hierunter fallen verschiedene Arthritiden, aber auch IGF-Mangelzustände anderer Ursachen.

Weiterhin bewirkt die Anwesenheit von Interleukin-1 $\beta$ , vorwiegend vorhanden in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis, einige metabolische Veränderungen in der Biologie der Chondrozyten. So verschlechtert sich z.B. die Produktion von Nitridoxid und 92-kDA-Gelatinase. Allerdings scheinen diese Veränderungen abhängig vom Differenzierungsgrad der Chondrozyten zu sein. Lemare [LEMARE, 1998] konnte verdeutlichen, daß sich diese Veränderungen in Chondrozyten, die für zwei Wochen in einer Alginatkultur gehalten wurden, vollständig zurückbildeten.

Es wurde also ermittelt, daß sich insbesondere eine hohe IGF-I-Konzentration in der Synovialflüssigkeit positiv auf das Heilungsverhalten von Chondrozyten auswirkt. Dies haben wir in unserer Arbeit durch die Zugabe von IGF in die Nährlösung nachgestellt.

Wie kann man aber nun die Konzentration dieses Wachstumsfaktors im Gelenk sinnvoll erhöhen?

Die Wirkung der intraartikuläre Injektion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- $\beta$ 1, IGF-I oder BMP-2 auf die Knorpelstimulation sind auf der Basis zahlreicher in vitro-Studien untersucht worden [CUEVAS, 1988; ELFORD, 1992, DUNN, 1994; VAN BEUNINGEN, 1994; VAN DEN BERG, 1995].

Neidel [NEIDEL, 1992] fand heraus, daß die intraartikuläre Gabe von IGF, FGF oder TGF keine Wirkung auf die Heilung von normalen Knorpeldefekten hat. Trotz der Tatsache, daß die erhobenen Daten noch spärlich sind, kann davon ausgegangen werden, daß die Bildung von osteophytären Anbauten in Zusammenhang mit der intraartikulären Gabe von TGF- $\beta$ 1 den Einsatz der Wachstumsfaktoren limitieren [ELFORD, 1992; VAN BEUNINGEN, 1993; HSIEH, 1997]. Für das effektive Einbringen von Wachstumsfaktoren oder anderen bioaktiven Wirkstoffen ist die lokale Implantation von Wachstumsfaktoren mit Hilfe eines Trägers in den Defekt der Gelenkoberfläche ein weitaus attraktiveres Konzept [HUNZIKER, 1996]. Diese Idee wird momentan untersucht und die bisher erhobenen Daten sind vielversprechend, müssen jedoch noch weiter unterlegt werden.

Weiterhin wird in einer Beobachtung von Van den Hoogen et al. [VAN DEN HOOGEN, 1998; VAN DE LEST, 2000] deutlich, daß die bekannte positive Wirkung von Bewegung und Belastung auf den Proteoglykanstoffwechsel des Knorpels zumindest teilweise über eine Erhöhung des IGF-I-Spiegels in der Synovialflüssigkeit vermittelt wird. Immobilisation bzw. ein statischer Druck hemmt nachweislich die Bildung von Matrixproteinen [GRAY, 1988; WONG, 1997]. Dagegen bewirkt eine zyklische Belastung (Bewegung/CPM) eine Stimulation der Synthese [HALL, 1991]. Der Grad der Stimulation ist dabei jedoch abhängig von der Stärke und der Position des Druckes. Zusätzlich variiert der Stimulationsgrad im Versuch zwischen verschiedenen Tieren. Druckwerte im physiologischen Bereich (5-15 Mpa), anhaltend für jeweils 2 Sekunden über 5 Minuten, stimulierten die Synthese verschiedener Matrixbestandteile für etwa zwei Stunden. So ist bei einer Einwirkung von zyklischen hydrostatischen Drücken ein Anstieg der Proteoglykansynthese in Chondrozyten nachweisbar [LEE, 1981; CHEN, 1997; CHEN, 1998].

Somit könnte sich eine, dem Ausmaß des Defektes angepaßte, intermittierende Bewegung bzw. Belastung des betroffenen Gelenkes, positiv auf die Heilungskapazität des geschädigten Knorpels auswirken.

Eine weitere häufige Begründung weshalb Knorpel in vivo nicht heilt, ist, daß die Chondrozyten, die sprichwörtlich in der extrazellulären Matrix gefangen sind, nicht zu dem verletzten Areal migrieren [MANKIN, 1967; CAMPBELL, 1969; DEPALMA, 1969; FULLER, 1972; NEWMAN, 1998] oder sich nicht an die verletzte Knorpeloberfläche heften können [HUNZIKER, 1996; HUNZIKER, 1998]. Dieser Punkt ist durch unsere Arbeit anzuzweifeln, da auch der, unter Kulturbedingungen gehaltene, typisch native Knorpel die Fähigkeit zur Migration und Heilung gezeigt hat.

Als nächstes stellt sich die Frage, ob in den Seren (fetales Kälberserum, Schweineserum), die in der Zellkultur verwendet werden, Substanzen enthalten sind, die die Heilung von Knorpel nachweislich unterstützen.

Schulze [SCHULZE, 2000] zeigte hierbei, daß stabile zellassozierte Matrix im Alginattropfen in Medien, die bovines Serum enthielten, als auch in serumfreien Medien nachgewiesen werden konnte. Wichtig hierbei war nur die Anwesenheit von IGF-I in unterschiedlichen Konzentrationen.

Wenn man nun die Ergebnisse der dritte Versuchsreihe unserer Arbeit betrachtet, welche sich mit dem Zusammenheilen von nativem Knorpel mit in vitro gezüchtetem Knorpel beschäftigt hat, stellt sich die Frage, warum die heute angewendeten Verfahren häufig mit dem Niedergang der eingebrachten Zellen einher geht bzw. die eingebrachten Zellen oft nicht in den gegebenen Defekt einheilt [TEMENOFF, 2000] oder sich schließlich in Faserknorpel umwandelt [BREINAN, 1997; MONT, 1999].

Dies beruht wahrscheinlich vor allem darauf, daß die gezüchteten Gewebekonstrukte biochemische und biomechanische Eigenschaften aufweisen, die bei weitem nicht den Langzeitbeanspruchungen von hyalinem Gelenknorpel genügen können [SCHULZE, 2000].

Demgegenüber stehen jedoch auch Transplantationen mit guten bis exzellenten Ergebnisse von Peterson et. al. [PETERSON, 2000] und Brittberg

et. al. [BRITTBERG, 1994; BRITTBERG, 1996]. Was ist also die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse?

Knorpelgewebe eignet sich besonders gut für die Gewebezüchtung in vitro. So besteht der Gelenkknorpel lediglich aus einer Zellart, den Chondrozyten. Gefäße und Nerven sind im Gelenkknorpel nicht angelegt. Die Ernährung der Knorpelzellen erfolgt auch in vivo per diffusionem. Knorpelzellen können sämtliche Matrixproteine in ausreichender Qualität und Menge produzieren. Carranza [CARRANZA, 1999] versucht Knorpelzellen aus unterschiedlichen Geweben zu züchten. So wurden bei Kaninchen Zellen aus Periostlappen aus der Tibia und aus dem Rippenperichondrium entnommen. Das hieraus gezüchtete Knorpelgewebe bestand jedoch ausschließlich aus Faserknorpel.

Es ist also bekannt, daß Knorpelzellen in der Zellkultur innerhalb kürzester Zeit deutliche Veränderungen mit dem Auftreten von fibroblastenähnlichen Zellformen und dem Verlust der knorpelspezifischen Kollagentypen aufzeigen. Die molekularbiologischen Untersuchungen bestätigen die Dedifferenzierung humaner artikulärer Chondrozyten in Monolayerkultur mit deutlicher Veränderung der Genexpression zwischen Chondrozyten und dedifferenzierten fibroblastenähnlichen Zellen [SCHNABEL, 2002]. In der klinischen Anwendung der autologen Chondrozytentransplantation zeigen die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen des gebildeten Reparaturgewebes die Ausbildung eines faserknorpeligen Mischgewebes, welches sich deutlich vom angrenzenden hyalinen Gelenkknorpel unterscheidet [BREINAN, 1997; MONT, 1999].

Des Weiteren steht eine ausreichende Ausgangsdichte der Zellzahl oft nicht zur Verfügung [LEMARE, 1998]. Daher wird von einigen Autoren eine Dedifferenzierung in vitro zugunsten einer gesteigerten Zellproliferation in Kauf genommen oder sogar erwünscht. Dedifferenzierung bedeutet, daß anstelle des knorpelspezifischen Kollagens Typ II vermehrt Kollagen I produziert wird. Diese Dedifferenzierung soll sich später bei der Transplantation auf ein dreidimensionales Trägermaterial in vitro oder in vivo [SITTINGER, 1994; VACANTI, 1994; RUDERT, 1998] in eine Redifferenzierung umkehren.

Da nur eine stabile und vor allem gewebetypische extrazelluläre Matrix eine Garantie für ein funktionstüchtiges Gewebekonstrukt geben kann, sollte den Chondrozyten die Möglichkeit gegeben werden, eine stabile und knorpelspezifische extrazelluläre Matrix aufzubauen. Dies wurde in unserer Arbeit gezeigt. Das System, das dafür sehr gut geeignet scheint, ist das Alginsystem als 3-D-Kultursystem [RAHFOTH, 1998; SCHULZE, 2000]. Nach diesem Grundkonzept für die Gewebezüchtung wurde bisher in unterschiedlichen Arbeitsgruppen verfahren. Wegweisende Arbeit leisteten Bostoner Arbeitsgruppen um die Brüder Joseph und Charles Vacanti, Robert Langer und Freed [VACANTI, 1991; VACANTI, 1993; FREED, 1993; LANGER, 1993]. Vacanti entnahm Knorpel aus den Schultergelenken neugeborener Kälber, isolierte die Chondrozyten und beimpfte verschieden PGA- bzw. PLLA-Polymerträger. Nach in vitro Kultivierung auf den Polymeren wurden die Chondrozyten-Polymer-Komplexe unter die Haut von Nackmäusen implantiert. Nach Explantation zeigte sich ein dem hyalinen Knorpel ähnliches Gewebe. Dieses enthielt Glycosaminoglycane und Kollagen als typische Bestandteile der extrazellulären Matrix von Gelenkknorpel [VACANTI, 1991; VACANTI, 1993; PUELACHER, 1994].

Sittinger und Bujia [SITTINGER, 1994] verwendeten als Spendermaterial humanen Knorpel des Femurkopfes. Nach Vermehrung in Monolayerkulturen wurden die Zellen über die Polymere gegeben. Dieser Zell-Polymer-Komplex wurde nun mit Agarose umgeben und in einem automatischen Kultursystem weiter kultiviert. Eine Implantation erfolgte nicht. Auch hier zeigten die anschließenden Analysen den Gehalt von Glycosaminoglycanen und Kollagen [SITTINGER, 1994; BUJIA, 1995].

Es gibt noch eine Zahl weiterer Autoren, die die oben genannten Ansätze beschreiben. Sie unterscheiden sich vor allem in der Art des Spenderknorpels [Kaninchen: O'DRISCOLL, 1984; O'DRISCOLL, 1986; WAKITANI, 1989; Huhn: ITAY, 1987; KLOMPMAKER, 1992], dem Alter der Tiere, der Kultivierungsdauer oder dem Trägermaterial.

Allen oben genannten Arbeiten ist gemein, daß dem hyalinen Knorpel ähnliches Gewebe in vitro produziert wird.

Schulze konnte nachweisen, daß humane Chondrozyten während einer in-vitro Kultivierungsphase in Alginatkultur eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix, die in ihrem Aufbau der nativen Matrix ähnelt, produzieren. Die Bildung dieser knorpelspezifischen extrazellulären Matrix mit Kollagen Typ II beginnt ca. 3-4 Tage nach Überführung in Alginat-Beads [SHAKIBAEI, 1997]. Es dauert jedoch ca. 14 Tage, um die Synthese von Kollagen I und III, Indikatoren für einen veränderten Phenotyp, vollständig zu unterdrücken [LEMARE, 1998]. So werden die Chondrozyten ab dem 14. Tag von einer zellassozierten Matrix, die eine biochemische Stabilität aufweist, umgeben. Sowohl im Hinblick auf eine Akkumulation von Kollagenen als auch von Proteoglykanen [MOK, 1994]. Eine ausreichende und knorpelspezifische Anhäufung von Kollagenen und Proteoglykanen in der zellulären Matrix wird bereits nach einem Zeitraum von sieben Tagen in der Alginatkultur angetroffen [SCHULZE, 2000]. Wenn die Chondrozyten jedoch zu lange, daß heißt länger als zwei Monate in der Alginatkultur verbleiben, wird die Genexpression von Kollagen Typ II supprimiert [CHUBINSKAYA, 2001]. Dies könnte daran liegen, daß die Chondrozyten dann bereits eine ausreichend stabile extrazelluläre Matrix produziert haben.

Mit diesen Aussagen wird deutlich, dass Chondrozyten, wie in unserer Arbeit behandelt, vor einer Transplantation in einem dreidimensionalen Kultursystem redifferenziert werden sollten. Hierbei wird ihnen die Möglichkeit, eine ausreichend stabile und dem hyalinen Knorpel ähnliche, extrazelluläre Matrix aufzubauen, gegeben.

Ein wie von uns vorgestellter Versuchsaufbau fand sich in den Veröffentlichungen nicht. Keine Arbeitsgruppe hat bisher die Durchführung von Co-Kulturen mit in vitro produziertem Knorpelgewebe und in vivo gewonnenem Knorpelgewebe veröffentlicht. Obwohl diese Co-Kulturen eine wichtige Aussage über das prinzipielle Heilungsverhalten und die prinzipielle Heilungskapazität von Knorpel bieten.

Im Rahmen der Fertigstellung dieser Arbeit wurde in der Augustausgabe des Journal of Bone and Mineral Research 2002 eine Arbeit der Arbeitsgruppe von U. Anderer und J. Libera [ANDERER, 2002] vorgestellt, in der u.a. Co-Kulturen

von in vitro produziertem Knorpelgewebe (human) mit in vivo gewonnenem Knorpel aus osteoarthritischen Kniegelenken durchgeführt wurden. Die Autoren konnten nachweisen, daß es zwischen den beiden Knorpelgeweben zu einem engen Kontakt kam. Zellen des in vitro generierten Gewebes integrierten gut in den in vivo gewonnenen Knorpel, so daß hier eine Bestätigung der von uns gewonnenen Ergebnisse erfolgt ist. Die histologischen Analyseverfahren (HE-Färbung) zeigten vergleichbare Resultate wie die in unserer Arbeit vorgestellten.

## **5 Zusammenfassung**

Verletzter Gelenkknorpel zeigt in vivo keine Tendenz zur hyalinen Reparatur. Um zu untersuchen, ob erstens hyaliner Knorpel generell die Fähigkeit zur Heilung unter Kulturbedingungen besitzt und ob es dabei zu einer Defektauffüllung mit einer, dem hyalinen Knorpel ähnlichen Substanz kommt und ob zweitens in vitro hergestellter Knorpel diese Eigenschaften ebenfalls aufweist sowie mit nativem Knorpel zusammen heilen kann, wurde in der hier vorgestellten Arbeit die Heilungskapazität dieser zwei Knorpelarten einzeln und in Kombination untersucht.

Dafür wurden drei Versuchsreihen konzipiert. In der ersten Gruppe wurden Knorpelchips entnommen, zerschnitten und zusammengenäht. Im zweiten Versuch wurden Knorpel pellets in vitro hergestellt, der Länge nach zerschnitten und zusammengenäht. In der dritten Versuchsreihe erfolgte das Zusammennähen von in vitro hergestelltem Knorpel mit nativem Knorpel. Wichtig dabei war es die Chondrozyten für den in vitro hergestellten Knorpel nach Isolierung und Dedifferenzierung in eine dreidimensionale Anordnung, mittels Alginat-Beads, zur Redifferenzierung zu bringen. In den nachfolgenden 14 Tagen hatten die Zellen Zeit, den für hyalinen Knorpel typischen Kollagen II Typ zu produzieren.

Nach histologischer, immunhistologischer und rasterelektronenmikroskopischer Auswertung konnten wir beweisen, daß nativer Knorpel unter Kulturbedingungen heilt. Weiter zeigte sich auch eine Heilungskapazität bei in vitro hergestelltem Knorpel und eine komplette Überbrückung des gesetzten Schnittes bei den Kombinationspräparaten. Alle Schnitte waren vollständig und fehlerlos zusammengeheilt. In der immunhistologischen Auswertung zeigte sich im Schnittbereich des nativen Knorpels eine Präsenz von für hyalinen Knorpel typischen Kollagen II. Bei den in vitro Präparaten zeigte sich an den Schnittflächen Kollagen I, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kollagen II.

Mit den durchgeführten Versuchsreihen konnten wir zeigen, daß frisch durchtrennte Knorpelflächen, ex vivo wie auch in vitro unter Kulturbedingungen heilen können.

Damit bestehen grundsätzlich gute Voraussetzungen für das Einheilen von „tissue engineerem“ Gelenkknorpel.

## **6      Literaturverzeichnis**

Adams ME (1993) An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, hylan, in the treatment of osteoarthritis. J Rheumatol Suppl 39:16-8.

Aglietti P, Buzzi R, Bassi PB, Fioriti M (1994) Arthroscopic drilling in juvenile osteochondritis dissecans of the medial femoral condyle. Arthroscopy 10:286-91.

Altman RD, Kates J, Chun LE, Dean DD, Eyre D (1992) Preliminary observations of chondral abrasion in a canine model. Ann Rheumat Dis 51:1056-62.

Amiel D, Coutts RD, Abel M, Stewart W, Harwood F, Akeson WH (1985) Rib perichondrial grafts for the repair of full thickness articular cartilage defects. An morphological and biochemical study in rabbits. J Bone Joint Surg Am 67-A: 911-20.

Anderer U, Libera J (2002) In vitro engineering of human autogenous cartilage. J Bone Miner Res 17(8): 1420-9.

Anderson DR (1964) The ultrastructure of elastic and hyaline cartilage of the rat. Am J Anat 114:403.

Armstrong CG, Mow VC (1982) Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. J Bone Joint Surg Am 64:188-94.

Aydelotte MB, Kuettner KE (1988) Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix products. Conn Tiss Res 18: 205-22.

Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE (1992) Heterogeneity of articular chondrocytes. Articular Cartilage and Osteoarthritis 237-49. Edited by K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron, and V.C. Hascall. New York, Raven Press.

Baumgaertner MR, Cannon WD Jr, Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC (1990) Arthroscopic debridement of the arthritic knee. Clin Orthop 253: 197-202.

Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE (1992) Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. J Bone Joint Surg Br 74-B (1): 105-10

Behrens F, Shepard N, Mitchell N (1976) Metabolic recovery of articular cartilage after intra-articular injections of glucocorticoid. J Bone Joint Surg Am 58-A: 1157-60.

Bello AE, Garrett WE Jr, Wang H, Lohnes J, DeLong E, Caterson B, Kraus VB (1997) Comparison of synovial fluid cartilage marker concentrations and chondral damage assessed arthroscopically in acute knee injury. Osteoarthritis Cartilage 5(6): 419-26.

Benya PD, Padilla S, Mimni ME (1978) Independent regulation of collagen types of chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. Cell 15: 1313-21.

Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 30: 215-24.

Bobic V (1996) Arthroscopy osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary clinical study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 3: 262-4.

Bradley J, Dandy DJ (1989) Results of drilling osteochondritis dissecans before skeletal maturity. J Bone Joint Surg Br 71-B(4): 642-4.

Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M (1997) Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. J Bone Joint Surg Am 79-A: 1439-51.

Brittberg M, Lindahl A., Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. New England J Med 331:889-95 6.

Brittberg M, Faxen E, Peterson L (1994 II) Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee osteoarthritis. A prospective 4-year follow up of 37 patients. Clin Orthop 307: 155-64.

Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L (1996) Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. Clin Orthop 270-83.

Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L (2001) Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. Clin Orthop (391 Suppl): 337-48.

- Bruns J, Behrens P (1997) Die Transplantation von autogenem Rippenperichondrium zur Behandlung von tiefen Gelenkknorpeldefekten. In: Knieinstabilität-Knorpelschaden, A.B. Imhoff, Burkhart A. (Hrsg.), Editor. Steinkopff: Darmstadt. p. 82-88.
- Buckwalter JA (1988) Articular cartilage: Composition and structure. In: Woo SL-Y, Buckwalter JA (eds): Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues. Park Ridge, IL, AAOS, 1988, pp. 405–425.
- Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB (1990) Articular cartilage: composition, structure, response in injury, and methods of facilitation repair. Articular Cartilage and Knee Joint Function. Basic Science and Arthroscopy, Bristol-Myers/Zimmer Orthopaedic Symposium, pp. 19-56. Edited by J.W. Ewing. New York, Raven Press.
- Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliff A (1994) Restoration of injured or degenerated articular cartilage. J Am Acad Orthop Surg 2:192–201.
- Buckwalter JA (1995) Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries. Iowa Orthop J 15: 29-42.
- Buckwalter JA, Lane NE (1996) Aging, sports and osteoarthritis. Sports Med and Arthroscop Rev 4:276-87.
- Buckwalter JA, Lane NE (1997 I) Athletics and osteoarthritis. Am J Sports Med 25: 873-81.
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1997 II) Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interaction. J Bone Joint Surg Am 79A: 600–11.
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1997 III) Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. J Bone Joint Surg Am 79A: 612–32.
- Buckwalter JA (1999) Articular cartilage. Clin Orthop Oct (367suppl): 239-43 rev.
- Buckwalter JA (2002) Articular cartilage injuries. Clin Orthop (402): 21-37.
- Bujia J, Sittinger M, Minuth WW, Hammer C, Burmester G, Kastenbauer E (1995) Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. Acta Otolaryngol 115(2):307-10.
- Bulstra SK, Homminga GN, Buurman WA, Terwindt-Rouwenhorst E, van der Linden AJ (1990) The potential of adult human perichondrium to form hyaline cartilage in vitro. J Orthop Res 8: 328-35.

Burkart AC, Schoettle PB, Imhoff AB (2001) Operative Therapiemöglichkeiten des Knorpelschadens. Unfallchirurg 104:798-807.

Calandruccio RA, Gilmer WS (1962) Proliferation, regeneration, and repair of articular cartilage of immature animals. J Bone Joint Surg 44-A: 431-455.

Campbell CJ (1969) The healing of cartilage defects. Clin Orthop 64:45-63.

Carranza-Bencano A, Perez-Tinao M, Ballesteros-Vazquez P, Armas-Padron JR, Hevia-Alonso A, Martos-Crespo F (1999) Comparative Study of the reconstruction of the articular cartilage defects with free costal perichondrial grafts and free tibial grafts: An experimental study on rabbits. Calcif Tissue Int 65:402-7.

Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA (2001) Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. J Histochem Cytochem 49(10): 1211-20.

Convery FR, Akeson WH, Keown GH (1972) The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. Clin Orthop 82:253-262.

Convery FR, Meyers MH, Akeson WH (1991) Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. Clin Orthop 273: 139-45.

Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Sah RL (1997) Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro. J Orthop Res 15 (6): 791-802.

Chen AC, Sah RL (1998) Effect of static compression on proteoglycan biosynthesis by chondrocytes transplanted to articular cartilage in vitro. J Orthop Res 16(5): 542-50.

Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE (1999 I) Repair of articular cartilage defects: Part I. Basic Science of cartilage healing. Am J Orthop 28(1): 31-3.

Chen FS; Frenkel SR, Di Cesare PE (1999 II) Repair of articular cartilage defects: Part II. Treatment options. Am J Orthop 28(2): 88-96.

Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D (1995) Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocytes-seeded biodegradable porous polylactid acid (PLA): a tissue-engineering study. J Biomed Mater Res 29: 1147-54.

Chvapil M (1977) Collagen sponge: theory and practise of medical applications. J Biomed Mater Res 11: 721-41.

Coletti JM Jr, Akeson WH, Woo SL-Y (1972) A comparison of the physical behavior of normal articular cartilage and the arthroplasty surface. *J Bone Joint Surg Am* 54-A:147–160.

Cuevas P, Burgos J, Baird A (1988) Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 611-8.

DeGroot J (2000) Age-related decrease of articular cartilage susceptibility to proteolytic degradation. Poster Session – Cartilage Degradation. 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, March 12-15, 2000, Orlando, Florida.

Delaney JP, O'Driscoll SW, Salter RB (1989) Neochondrogenesis in free intraarticular periosteal autografts in an immobilized and paralyzed limb. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 248: 278-82.

DeLoes M, Dahlstedt LJ, Thomee R (2000) A 7-year study on risks and costs of knee injuries in male and female youth participants in 12 sports. *Scand J Med Sci Sports* 2000 10(2): 90-7.

DePalma AF, McKeever CD, Subin DK (1966) Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and orthoradiography with tritiated thymidin. *Clin Orthop* 48: 229-42.

Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC (1991) Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Vet Surg* 20:434–445.

Dunn AR, Dunn SL (1994) Method of regenerating articular cartilage. United States Patent No. 5,368,051 Issued on Nov. 29.

Elford PR, Graeber M, Ohtsu H, Aeberhard M, Legendre B, Wishart WL, MacKenzie AR (1992) Inducting of swelling, synovial hyperplasia and cartilage proteoglycane loss upon intraarticular injection of transforming growth factor beta 2 in the rabbit. *Cytokine* 4: 232-8.

Erggelet C, Steinwachs M (2001) Gelenkknorpeldefekte. Steinkopfverlag Darmstadt pp. 3-15.

Eyre DR (1995) Collagen structure and function in articular cartilage: metabolic changes in the development of osteoarthritis. In: *Osteoarthritic Disorders*, pp. 219-29. Edited by K.E. Kuettner and V.M. Goldberg. Rosemont, Illinois, The American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Farmer SR, Dike LE (1989) Cell shape and growth control: Role of cytoskeleton-extracellular matrix. In: Stein WD, Bonner F (eds). *Cell Shape:*

Determinants, Regulation and Regulatory Role. San Diego: Academic Press. pp. 173-204.

Fuller JA, Ghdially FN (1972): Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. Clin Orthop 86:193-205.

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. J Bone Joint Surg Am 62(A): 79-89.

Freed LE, Vunjak-NovaKovic G, Langer R (1993 I) Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. J Cell Biochem 51: 257-64.

Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R (1993 II) Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res 27: 11-23.

Freed L (1994) Kinetics of chondrocyte growth in Cell-Polymer Implants. Biotechnology and Bioengineering 43:597-604.

Fuller CJ, Barr AR, Sharif M, Dieppe PA (2001) Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. Osteoarthritis Cartilage 9(1): 49-55.

Gallay SH, Miura Y, Comisso CN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW (1994) Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. J Orthop Res 12: 515-25.

Garrett JC (1993) Osteochondral Allografts. Instr Course Lect 42: 355-8.

Ghdially JA, Ghdially R, Ghdially FN (1977) Long-term results of deep defects in articular cartilage. A scanning electron microscope study. Virchows Arch B Cell Pathol 25(2):125-36 27.

Ghivizzani SC (2000) Cartilage injury and repair. Scientific principles of sports rehabilitation 11:2.

Grande DA, Singh IJ, Pugh J (1987) Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. Anat Rec 218: 142-8.

Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M (1989) The repair of experimentally produced defect in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. J Orthop Res 7: 208-18.

Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R (1997) Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of tissue cartilage grafts. J Biomed Mater Res 34: 211-20.

Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE (1999) Cartilage Tissue Engineering: Current limitations and solutions. Clin Orthop 367:176-85.

Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC (1988) Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. J Orthop Res 6(6): 777-92.

Grundmann E (1986) Spezielle Pathologie. Urban&Schwarzenberg pp. 198-203.

Hadaker WT jr, Garrett WE jr, Bassett FH 3. (1990) Evaluation of acute traumatic haemarthrosis of the knee joint. Southern Med J 83: 640-4.

Hall AC, Urban JP, Gehl KA (1991) The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. J Orthop Res 9(1): 1-10.

Hall-Craggs ECB (1990) The head and the neck. In: Anatomy as a Basis for Clinical Medicine. Baltimore, Urban & Schwarzenberg p. 504.

Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Eberhardt R (1997 I) Treatment of osteochondritis dissecans of the talus: Use of the mosaicplasty technique-a preliminary report. Foot and Ankle Internat 18: 628-34.

Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I (1997 II) Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. Knee Surg 5:262-7.

Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J (1992) Aggrecan, the chondroitin/keratan sulfate proteoglycan from cartilage. In: Articular Cartilage and Osteoarthritis, 5-20. Edited by K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron, and V.A. Hascall. New York, Raven Press.

Hasler EM, Herzog W, Wu JZ, Muller W, Wyss U (1999) Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biomechanic response. Critical reviews in biomedical engineering 27(6): 415-88.

Hilgert RE, Dallek M, Jungbluth KH (1996) Das Verletzungsmuster beim Inline-Skating, Verletzungsmechanismen und Prävention. Dtsch Z Sportmed 47: 574-6.

Homandberg GA, Wen C, Hui F (1998) Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis cartilage* 6(4): 231-44.

Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, Van der Linden AJ (1990) Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 72B: 1003-7.

Homminga GN, Bulstra SK, Kuijjer R, van der Linden AJ (1991) Repair of sheep articular cartilage defects with a rabbit costal perichondrial graft. *Acta Orthop Scand* 62: 415-418.

Hsieh PC (1997) Repair of articular cartilage defects with periosteum pre-incubated in vitro with rh-TGF-beta 1. *Orthop. Trans* 20: 581-2.

Hudelmaier M, Glaser C, Hohe J, Englmeier KH, Reiser M, Putz R, Eckstein F (2001) Age-related changes in the morphology and deformational behaviour of the knee joint cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 44(11): 2556-61.

Hunter W (1743) On the structure and diseases of articulating artillages. *Philos Trans R Soc Lond* 42B:514–21.

Hunter W (1995) The classic of the structure and disease of articulating cartilages. *Clin Orthop* 317:3-6.

Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am A*: 721-33.

Hunziker EB, Kapfinger E (1998) Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br* 80 (1): 144-50.

Hunziker EB (1999) Biologic repair of articular cartilage. *Clin Orthop* 367:135-46.

Hurtig MG, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL (1988) Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Canadian J Vet Res* 52:137-46.

Idowu BD, Knight MM, Bader DL, Lee DA (2000) Confocal analysis of cytoskeletal organisation within isolated chondrocyte sub-populations cultured in agarose. *The Histochemical Journal* 32: 165-74.

Imhoff A, Öttl G, Burkart A, Traub S (1999) Osteochondrale autologe Transplantation an verschiedenen Gelenken. *Orthopäde* 28: 33-45.

Imhoff AI (2000) Arthroscopic and open techniques for transplantation of osteochondral autografts and allografts in different joints. In: Grifka J, Ogilvie-Harris J (eds) Osteoarthritis. Springer, Berlin Heidelberg.

Insall J (1974) The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. Clin Orthop 101: 61-7.

Itay S, Abromovici A, Nevo Z (1987) Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in Chick articular cartilage. Clin Orthop 200: 284-303.

Iwata H (1993) Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. Clin Orthop 289:285-91.

Jackson R, Marrans H, Silber R (1988) Arthroscopic treatment of degenerative arthritis of the knee. J Bone Joint Surg Br 70-B: 332.

Jackson R (1991) Arthroscopic treatment of degenerative arthritis. In: McGinty JB (ed) Operative Arthroscopy. Raven Press, New York, pp. 319-23.

Jungqueira LC, Carniero J (1971) Histologie. Schiebler TH, Peiper u, Schneider F. Springer-Verlag pp. 160-8.

Johnson LL (1991) Arthroscopic abrasion arthroplasty. In: McGinty JB (ed) Operative Arthroscopy. Raven Press, New York, pp. 341-60.

Kang HJ, Han CD, Kang ES, Kim NH, Yang WI (1991) An experimental intraarticular implantation of woven carbon fiber pad into osteochondral defect of the femoral condyle in the rabbit. Yonsei Med J 32: 108-16.

Karagianes MT, Wheeler KR, Nilles JL (1975) Cartilage repair over porous metal implants. Arch Pathol 99: 398-400.

Key JA (1931) Experimental arthritis: The changes in joints produced by creating defects in articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 13:725–739.

Kim HKW, Moran ME, Salter RB (1991) The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. J Bone Joint Surg Am 73-A: 1301-15.

Klompemaker J, Jansen HW, Veth RP, Nielsen HK, deGroot JH, Pennings AJ (1992) Porous polymer implants for repair of full-thickness defects of articular cartilage: an experimental study in rabbit and dog. Biomaterials, Vol 13, 9:625-34.

Kreklau B, Sittinger M, Mensing MB, Voigt C, Berger G, Burmester GR, Rahmanzadeh R, Gross U (1999) Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants. *Biomater* 20:1743-9.

Lack W, Bosch P, Lintner F (1986) Influence of trypsin on the regeneration of hyaline articular cartilage. *Acta Orthop Scandinavica* 57: 123-5.

Langer R, Vacanti J (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-6.

Lee RC, Frank EH, Grodzinsky AJ, Roylance DK (1981) Oscillatory compressional behavior of articular cartilage and its associated electromechanical properties. *J Biochem Eng* 103: 280-92.

Lee DA, Salih V, Stockton EF, Stanton JS, Bentley G (1997) Effect of normal synovial fluid on the metabolism of articular chondrocytes in vitro. *Clin Orthop* 34(2): 228-38.

Lee DA, Noguchi T, Knight MM, O'Donnell L, Bentley G, Bader DL (1998) The response of chondrocyte sub-population cultured within unloaded and loaded agarose. *J Orthop Res* 16: 726-33.

Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M (1998) Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol* 176(2): 303-13.

Leonhardt H (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Band 3 Thieme Verlag Stuttgart 8. Auflage.*

Lexer E (1908) Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by free plastic operations. *Surg Gynecol Obstet* 6: 601-609.

Magnusson PB (1941) Joint debridement. Surgical treatment of degenerative arthritis. *Surg Gynecol Obstet* 73:1-9.

Maiotti M, Monteleone G, Tarantino U, Fasciglione GF, Marini S, Coletta M (2000) Correlation between osteoarthritical damage and levels of proteinases and proteinase inhibitors in synovial fluid from the knee joint. *Arthroscopy* 16(5): 522-6.

Mankin HJ, Conger KA (1966) The acute effects of intra-articular hydrocortisone on articular cartilage in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 48-A: 1383-8.

Mankin HJ, Boyle CJ (1967) The acute effects of lacerative injury on DNA and protein synthesis in articular cartilage. In Bassett CAL (ed):*Cartilage*

Degradation and Repair. Washington, DC, National Research Council-National Academy of Sciences-National Academy of Engineering pp. 185–199.

Mankin HJ (1974) The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. N Engl J Med 291: 1335-40.

Mankin HJ (1978) The water of articular cartilage. In: the human joint in Health and Disease pp. 37-42. Edited by W.H. Simon. Philadelphia, University of Pennsylvania Press.

Mankin HJ (1982) Current concepts review. The response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Joint Surg Am 64-A: 460-6.

Marles PJ, Hoyland JA, Parkinson R, Freemont AJ (1991) Demonstration of variation in chondrocyte activity in different zones of articular cartilage: an assessment of the value of in-situ hybridization. Int J Exp Pathol 72: 171-82.

Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H (1993) Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. Arthroscopy 9: 318-21.

Meachim G (1963) The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. J Bone Joint Surg Br 45-B(1): 150-61.

Meachim G, Roberts C (1971) Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee. J Anat 109: 317-27.

Messner K (1993 I) Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. J Biomed Mater Res 27: 1527-32.

Messner K, Gillquist J (1993 II) Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: A biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. Biomaterials 14: 513-21.

Meenen NM, Jures TT, Adamietz P, Lorke DE, Dallek M, Jungbluth KH (1993) Der Effekt von synthetischer HA-Keramik auf Langzeitkulturen isolierter Chondrocyten. Unfallchirurgie 5: 257-66.

Meenen NM, Rischke B, Adamietz P, Dauner M, Fink J, Gopfert C, Rueger JM (1998 I) Treatment of cartilage defects. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd 115:568-76. Review. German.

Meenen NM, Rischke B, Adamietz P, Dauner M, Fink J, Gopfert C, Rueger JM (1998 II) Knorpeldefektbehandlung. Langenbecks Arch Chir Suppl II Kongreßbericht 568-576.

Metsaranta M, Kujala UM, Pelliniemi L, Osterman H, Aho H, Vuorio E (1996) Evidence for insufficient chondrocytic differentiation during repair of full-thickness defects of articular cartilage. Matrix Biol (1):39-47.

Mikos A, Lyman MD, Freed LE, Langer R (1994) Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. Biomaterials 15:55-58.

Mink JH (1989) Occult cartilage and Bone injuries of the knee: Detection, classification and assessment with MRI imaging. Radiology 170(3):823-829.

Mitchell N, Shepard N (1976) The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral Bone. J Bone Joint Surg Am 58-A: 230-33.

Mitchell N, Shepard N (1987) Effect of patellar shaving in the rabbit. J Orthop Res 5: 388-92.

Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ (1994) Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate: identification of two distinct metabolic matrix pools. J Biol Chem 269: 33021-7.

Mont MA, Jones LC, Vogelstein BN, Hungerford DS (1999) Evidence of Inappropriate Application of Autologous Cartilage Transplantation Therapy in an Uncontrolled Environment. Am J Sports Med 27(5): 617-620.

Moore AR, Appelboom A, Kawabata K, DaSilva JA, D'Cruz D, Gowland G, Willoughby DA (1999) Destruction of articular cartilage by alpha-2-macroglobuline elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1999; 58(2): 109-13

Mow VC, Holmes MH, Lai WM (1984) Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. J Biomech 17:377-94.

Mow VC, Rosenwasser MP (1988) Articular cartilage. Biomechanics. In: injury and repair of the musculoskeletal soft tissues, pp. 427-63. Edited by S.L.-Y. Woo and J.A. Buckwalter. Park Ridge, Illinois, The American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Neidel JJ (1992) Keine Verbesserung der Gelenkknorpelheilung nach Trauma durch intraartikulärer Gabe von insulinartigem Wachstumsfaktor 1, epidermalem

Wachstumsfaktor und Fibroblasten-Wachstumsfaktor beim Kaninchen. Zeitschr Orthop Grenzgeb 130: 73-8.

Neidel J, Schulze M (2000) Stellenwert der Synovialanalyse für die Prognose der Matrixsynthese transplantierte Chondrozyten. Orthopäde 29: 158-63.

Netter FH (1987) The CIBA Collection of Medical Illustration, Volume 8: Musculoskeletal System Part I, Anatomy, Physiology and Metabolic Disorders. Ciba-Geigy Corporation, Summit, New Jersey. ISBN 0-914168-14-2. 173-5.

Newman AP (1998) Articular cartilage repair. Am J Sports Med 26(2):309-24

Nimni ME (1988) Collagen Volume II: Biochemistry and Biomechanics. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 244-65.

Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL (1980) Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee: incidence of anterior cruciate tears and other injuries. J Bone Joint Surg Am 62-A: 687-95.

Ochi M, Sumen Y, Jitsuiki J, Ikuta Y (1995) Allogeneic deep frozen meniscal graft for repair of osteochondral defects in the knee joint. Arch Orthop and Trauma Surg 114: 260-6.

O'Driscoll SW, Salter RB (1984) The induction of neochondrogenesis in free intraarticular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg Am 66-A: 1248-75.

O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1986 I) The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg Am 68-A: 1017-35.

O'Driscoll SW, Salter RB (1986 II) The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. Clin Orthop 208: 131-40.

O'Driscoll SW (1998) Current concepts review – The healing and regeneration of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 80: 1795-1812.

O'Driscoll SW, Ito Y, Fitzsimmons J (2000) Age-related decrease in chondrogenic potential correlates with a decrease in chondrocyte precursor

pool size. Poster Session – Cartilage Cell Biology. 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopedic Research Society, March 12-15, 2000, Orlando, Florida.

Olah EH, Kostenszky KS (1976) Effect of prednisolone on the glycosaminoglycan components of the regenerating articular cartilage. *Acta Biol Hungarica* 27: 129-34.

Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE (1995) The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 77-A: 65-72.

Palfrey AJ, Davies DV (1966) The fine structure of chondrocytes. *J Anat* 100: 213-26.

Pap K, Krompecher S (1961) Arthroplasty of the knee. *J Bone and Joint Surg Am* 43-A(4): 523-37.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A (2000) 2-9 year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 374: 212-34.

Pridie K (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg* 41-B: 618-9.

Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA (1994) Tissue-engineered growth of cartilage: The effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Internat J Oral and Maxillofac Surg* 23: 49-53.

Rae PJ, Noble J (1989) Arthroscopic drilling of osteochondral lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 71-B(3): 534.

Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R (1998) Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defect of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6(1): 50-65.

Rand JA, Ilstrup DM (1991) Survivorship analysis of total knee arthroplasty. Cumulative rates of survival of 9200 total knee arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* 73-A: 397-409.

Ravaud P, Moulinier L, Giraudeau B, Ayral X, Guerin C, Noel E, Thomas P, Fautrel B, Mazieres B, Dougados M (1999) Effects of joint lavage and steroid injection in patients with osteoarthritis of the knee: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 42(3): 475-82.

Rodrigo JJ, Steadman RJ, Silliman JF, Fulstone HA (1994) Improvement of full-thickness chondral defects healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. Am J Knee Surg 7: 109-16.

Ruder M (1998) Synthesis of articular cartilage-like tissue in vitro. Arch Orthop Trauma Surg 117: 141-6.

Ruuskanen MM, Kallioinen MJ, Kaarela OI, Laiho JA, Tormala PO, Waris TJ (1991) The role of polyglycolic acid rods in the regeneration of cartilage from perichondrium in rabbits. Scandinavian J Plast And Reconstr Surg And Hand Surg 25: 15-8.

Salter RB, Gross A, Hall JH (1967) Hydrocortisone arthropathy - an experimental investigation. Canadian Med Assn J 97:374-7.

Salter RB, Ogilvie-Harris DJ (1979) The healing of intraarticular fractures with continuous passive motion. In: instructional course lectures, American academie of orthopaedic surgeons. Vol 28, pp. 102-17. St. Louis, C.V.Mosby.

Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND (1980) The biological effect of continuous passive motion on the healing of full thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg Am 62-A: 1232-51.

Salter RB (1989) The biologic concept of continuous passive motion of synovial joints. The first 18 years of basic research and its clinical application. Clin Orthop 242: 12-25.

Saxon L, Finch C, Bass S (1999) Sports participation, sports injuries and osteoarthritis: implications for prevention. Sports Med 28: 123-35.

Schieber RA, Branche-Dorsay CM, Ryan GW (1994) Comparison of inline skating injuries with rollerskating and skateboard injuries. JAMA 271:1856-8.

Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J (2002) Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis Cartilage 10(1): 62-70.

Schulze M, Kuettner KE, Cole AA (2000) Adulte humane Chondrozyten in Alginatkultur. Orthopäde 29: 100-6.

Sellers RS, Pelluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human Bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 79-A: 1452-63.

Shakibaei M, De Souza P (1997) Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* 21(2): 75-86.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75-A:532–553.

Shoemaker RS, Bertone AL, Martin GS, McIlwraith CW, Roberts ED, Pechman R, Kearney MT (1992) Effects of intraarticular administration of methylprednisolone acetate on normal articular cartilage and on healing of experimentally induced osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* 53: 1446-53.

Silberberg M, Silberberg R, Hasler M (1966) Fine structure of articular cartilage in mice receiving cortisone acetate. *Arch Pathol* 82:569-82.

Silver FH, Parsons JR (1991) Repair of skin, bone and cartilage. In: Glasgold AI, Silver FH (eds): *Application of Biomaterials in Facial Plastic Surgery*. Boca Raton, FL, CRC Press, p. 65.

Silver FH, Moss CS (1994) Biology of facial implant materials. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 2:241.

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR (1994 I) Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 15: 451-6.

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR (1994 II) In vitro formation of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces. *Biomaterials* 15: 451-6.

Spindler KP (1993) Prospective study of osseous, articular, and meniscal lesions in recent anterior cruciate ligament tears by magnetic resonance imaging and arthroscopy. *Am J Sports Med* 21(4): 551-557.

Steadman JR (1997) Long-term results of full-thickness articular cartilage defects of the knee treated with débridement and microfracture. Read at the Linvatec Sports Medicine Conference, Vail, Colorado Feb 1.

Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde* 28: 26-32.

Steadman JR (2000) Microfracture procedure for treatment of full thickness chondral defects: technique, clinical results and current basic science status. In:

Harner CD, Vince KG, Fu FH (eds) Techniques in knee surgery. Williams&Williams, Media/PA.

Stone KR, Walgenbach A (1997) Surgical technique for articular cartilage transplantation to full thickness cartilage defects in the knee joint. In: Operative techniques in Orthopaedics, W.B.e. Saunders (ed), pp. 305-311.

Sumen Y, Ochi M, Ikuta Y (1995) Treatment of articular defects with meniscal allografts in a rabbit knee model. Arthroscopy 11: 185-93.

Temenoff JS, Mikos AG (2000) Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterial 21: 431-440.

Thompson RC (1975) An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint. Clin Orthop 107:239–248.

Tippett J (1991) Articular cartilage drilling and osteotomie in osteoarthritis of the knee. Operative Arthroscopy. NY Raven Press, pp. 325-39.

Tittel K (1994) Beschreibende und funktionelle Anatomie des Menschen. Urban & Fischer Verlag, 12. Auflage.

Twyman RS, Desai K, Aichroth PM (1991) Osteochondritis dissecans of the knee. A long term Study. J Bone Joint Surg Br 73-B(3): 461-4.

Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP (1991) Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast Reconstr Surg 88: 753-9.

Vacanti CA (1993) Tissue engineered composites of Bone and cartilage using synthetic polymers seeded with two cell types. Proc Orthop Res Soc CA 276.

Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP (1994) Joint resurfacing with cartilage grown from cell-polymer structures. Am J Sports Med 22:485-8.

Vachon A, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S (1986) Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal Bone with and without subchondral Bone perforation. Am J Vet Res 47: 2637-45.

Van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB (1993) Does TGF-beta protect articular cartilage in vivo? Agents and Actions 39: 127-31.

Van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg (1994) Stimulation of osteophyte formation and cartilage proteoglycan synthesis by intraarticular injected TGF-beta. Orthop Trans 17: 714-5.

Van de Lest CH (2000) Loading-induced changes in synovial fluid affect cartilage metabolism. *Biorheology* 37(1-2): 45-55.

Van den Berg WB (1995) Growth factors in experimental osteoarthritis: Transforming growth factor beta pathogenic? *J Rheumatol* 43:143-5.

Van den Hoogen BM, van de Lest CH, van Weeren PR, Lafeber FP, Lopes-Cardoso M, van Golde LM, Barneveld AI (1998) Loading-induced changes in synovial fluid affect cartilage metabolism. *Br J Rheumatol* 37: 671-6.

Vellet AD, Marks PH, Fowler PJ, Munro TG (1991) Occult posttraumatic osteochondral lesions of the knee: prevalence, classification, and short-term sequelae evaluated with MR imaging. *Radiology* 178(1): 271-6.

Von der Mark K, Conrad G (1979) Cartilage cell differentiation. *Clin Orthop* 139: 185-205.

Wagner H (1972) Possibilities and experiences with cartilage transplantation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 110(6): 705-8.

Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K (1989) Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 71-B(1): 74-80.

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76-A: 579-92.

Weise K (2000) Moderne Behandlungsstrategien in der Sporttraumatologie. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51:11.

Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG (1987) Funktionelle Histologie. Lehrbuch und Atlas. Urban & Schwarzenberg, München 1987, pp. 142-4.

Wong M, Wuethrich P, Buschmann MD, Egli P, Hunziker E (1997) Chondrocyte biosynthesis correlates with lokal tissue strain in statically compressed adult articular cartilage. *J Orthop Res* 15(2): 189-96.

Zarnett R, Delaney JP, Driscoll SW, Salter RB (1987) Cellular origin and evolution of neochondrogenesis in major full thickness defects of a joint surface treated by free autogenous periosteal grafts and subjected to continous passive motion in rabbits. *Clin Orthop* 222: 267-74.

## 7 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit in Rat und Tat beiseite gestanden haben.

Ganz besonders herzlich jedoch bei:

Herrn Prof. Dr. Norbert Meenen für die Überlassung dieses Themas, seine motivierende Begeisterungsfähigkeit, seine ausgezeichnete Betreuung sowie seine Geduld.

Herrn Dr. Jan-Phillip Petersen für die tatkräftige Unterstützung, die Beantwortung all meiner Fragen und seine Hilfe in manch schwierigen Situationen.

Herrn Prof. Dr. Johannes M. Rueger (Direktor der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungs- Chirurgie des UKE) und Herrn Dr. Michael Amling (Leiter der experimentellen Unfallchirurgie), die mir die Durchführung dieser Arbeit unter ihrer Schirmherrschaft und in den Laboren ermöglichten.

Herrn PD. Dr. Adamietz, Herrn Frank Feyerabend und Herrn Dr. Jens Schröder sowie Frau Ditte Simesgelüss aus der Abteilung für Biochemie für die bereitwilligen Hilfen und Antworten auf all meine Fragen biochemische Vorgänge betreffend.

Herrn Prof. Schumacher und besonders Claus Siebert aus der Abteilung für Neuroanatomie für die überaus freundliche Hilfe bei der Durchführung der Rasterelektronen-Mikroskopie.

Frau Olga Friess, Frau Cordula Möltner sowie Frau Dietzmann für die nette Einführung in die verschiedenen histologischen Auswertungsverfahren.

Herrn Klaus Baumbach nicht nur für sein mathematisches Verständnis, sondern auch für seine freundschaftliche Hilfe bei langwierigen Schneide- und Färbeaktionen.

Herrn Dr. Andreas Ruecker für seine große Hilfsbereitschaft sowie seinen motivierenden Optimismus die Fertigstellung dieser Arbeit betreffend.

Und zusätzlich noch bei Frau U. Oefinger, Herrn Dr. U. Grigoleit sowie Frau Dr. K. Foitzik.

Vielen Dank.

## **8 Lebenslauf**

Name: Wibke Dömeland

Geburtsdatum: 08.08.1972

Geburtsort: Sindelfingen

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. Gerd Dömeland, Tierarzt, gestorben 1975  
Dr. Sabine Dömeland geb. Reimann, Zahnärztin

1978-82 Grundschule Liebelsberg

1982-91 Hermann-Hesse-Gymnasium, Calw, Abitur 1991

Okt. 1991 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhardt-Karls-Universität in Tübingen

Aug. 1994 Ärztliche Vorprüfung

Okt. 1994 Wechsel zur medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Sept. 1995 1. Staatsexamen

Sept. 1998 2. Staatsexamen

Okt. 1998 Beginn des Praktischen Jahres mit dem Wahlfach Dermatologie an der Universität Hamburg. Währenddessen Aufenthalt für drei Monate am Groote Schuur Hospital in Kapstadt im Bereich der Herz-Thorax-Chirurgie.

Nov. 1999 3. Staatsexamen

März 2000 - August 2001: Anstellung als Ärztin im Praktikum in der Haut- und Poliklinik des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg

Sept. 2001 - Mai 2002: Anstellung als Assistenzärztin in der Haut- und Poliklinik des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg

Nov. 2002 - Jan. 2003: Anstellung als Weiterbildungsassistentin bei Prof. V. Steinkraus im Dermatologikum, Hamburg

Jan. 2004 - Juli 2004: Anstellung als Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Krankenhauses Bad Cannstatt, Stuttgart

Juli 2004 - heute: Anstellung als Weiterbildungsassistentin in der Praxis und Klinik Dres. Beckenbauer / Fedel, Böblingen

## **9 Erklärung / Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter in einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....