

Aus dem

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Molekulare Zellbiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
PD Dr. Peter Adamietz
Institutsdirektorin: Prof. Dr. Ulrike Beisiegel

**Herstellung von
Knorpelgewebe durch Aggregation
in vitro amplifizierter Chondrozyten
des Minipigs**

Dissertation

zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Till Wieman

aus Köln

Hamburg, 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 11. Juli 2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzender: PD Dr. P. Adamietz

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. N. Meenen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. M. Morlock

... für Mara, *27. Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	FUNKTIONELLE WIEDERHERSTELLUNG HYALINEN GELENKKNORPELS	1
1.2	FUNKTION UND STRUKTUR VON HYALINEM GELENKKNORPEL	1
1.3	FOLGEN DER GELENKKNORPELVERLETZUNG	2
1.4	OPERATIVE MÖGLICHKEITEN BEI GELENKKNORPELSCHÄDEN	3
1.5	ALTERNATIVE THERAPEUTISCHE KONZEPTE IN DER REGENERATIVEN MEDIZIN	4
1.6	DIFFERENZIERUNG VON CHONDROZYTEN	6
1.7	URSACHEN DER DEDIFFERENZIERUNG UND MÖGLICHKEITEN ZUR REDIFFERENZIERUNG	8
1.8	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	MATERIAL	10
2.1.1	Knorpelspender	10
2.1.2	Instrumente	10
2.1.3	Verbrauchsmaterial	11
2.1.4	Chemikalien	11
2.1.5	Ansätze	13
2.2	METHODEN	15
2.2.1	Isolierung von Gelenkknorpel-Chondrozyten	15
2.2.2	Proliferation von Gelenkknorpel-Chondrozyten	16
2.2.3	Verfahren der Chondrozyten-Aggregation	16
2.2.3.1	Sedimentations-Methode	16
2.2.3.2	Zentrifugations-Methode	17
2.2.4	Analytik	18
2.2.4.1	Zellzahlbestimmung	18
2.2.4.2	Ascorbinsäure-Messung	18
2.2.4.3	DNA-Bestimmung (nach KIM et al., 1988)	19
2.2.4.4	Bestimmung von Glykosaminoglykanen (nach FARNDALÉ et al., 1986)	19
2.2.4.4.1	Messung im Medium	19
2.2.4.4.2	Messung im Pellet	20
2.2.4.5	Immunoblot-Analyse zum semiquantitativen Nachweis von Kollagen	20
2.2.4.6	Bestimmung von Nitrit als Nachweis von Stickstoffmonoxid	22
2.2.4.7	Anfärbung von Knorpelschnitten mit Hämalaun-Eosin	23

3.	ERGEBNISSE	24
3.1	ZELLVERMEHRUNG FÜR DIE CHONDROGENESE DURCH OPTIMALE IN VITRO PROLIFERATION	24
3.2	CHONDROGENESE DURCH ZELL-ZELL-KONTAKTE IN VITRO VERMEHRTER CHONDROZYTEN	26
3.3	EINHALTUNG OPTIMALER ASCORBINSÄUREKONZENTRATIONEN IM MEDIUM ALS VORAUSSETZUNG DER IN VITRO CHONDROGENESE	28
3.4	ZEITLICHER VERLAUF DER BILDUNGSRATE VON KNORPEL AUS IN VITRO VERMEHRTE ZELLEN	30
3.5	EINFLUSS VON AGGREGATIONSTECHNIK UND ANTIOXIDANTIEN AUF DIE KNORPELBILDUNG IN VITRO	32
3.6	KATALASE VERHINDERT DIE FÜR DIE INITIIERUNG DER KNORPELBILDUNG NOTWENDIGE AGGREGATION DER CHONDROZYTEN – EDTA VERURSACHT SCHÄDEN BEI DER GEWEBEBILDUNG	38
3.7	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER GEBILDETEN KNORPELPROBEN WEISEN AUF APOPTOSEN ALS MECHANISMUS DES GEWEBEABBAUS HIN.	40
3.8	HINWEISE AUF STICKSTOFFMONOXID (NO) ALS MEDIATOR DES KNORPELABBAUS IN GEWEBEKULTUREN	41
4.	DISKUSSION	51
4.1	PROBLEMSTELLUNG UND LÖSUNGSKONZEPT	51
4.2	DER EINSATZ DES ZWEI-PHASEN-MODELLS	52
4.3	OPTIMIERUNG DER TECHNIK DER CHONDROZYTENAGGREGATION	54
4.4	OPTIMIERUNG DER MEDIUMZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE KNORPELBILDUNG IN VITRO	56
4.5	DIE ROLLE VON STICKSTOFFMONOXID (NO) BEI DER IN VITRO CHONDROGENESE	57
4.6	RESUMEE UND AUSBLICK	58
5.	ZUSAMMENFASSUNG	60
6.	LITERATURVERZEICHNIS	61
7.	DANKSAGUNG	74
8.	LEBENS LAUF	75
9.	ERKLÄRUNG	76

1. Einleitung

1.1 Funktionelle Wiederherstellung hyalinen Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel hat nach einer Schädigung nur begrenzte Fähigkeiten zur Selbstheilung. Verletzungen des Knorpels führen über degenerative Prozesse zum Krankheitsbild der Arthrose. Bei jungen wie älteren Patienten ist im fortgeschrittenen Stadium die Implantation eines künstlichen Gelenkersatzes häufig die letzte Therapiealternative. Versuche, die Knorpelheilung durch weniger invasive Methoden zur Regenerierung anzuregen führen zwar zur Induktion einer fibrösen Knorpelproduktion, nicht jedoch zur Wiederherstellung eines funktionell intakten hyalinen Knorpels mit seinen typischen Eigenschaften. Patienten erleben durch die Verfahren zwar eine temporäre Linderung ihrer Beschwerden, der weitere Verschleiß des Gelenkknorpels ist so jedoch nicht zu verhindern.

Vor diesem Hintergrund sind Konzepte entstanden, Gelenkknorpelschäden durch Transplantation von gesundem Gewebe zu heilen. Da die Quellen autologen Gewebes sehr knapp sind, erscheint die Möglichkeit der extrakorporalen Züchtung von transplantierbarem Knorpelgewebe unter Verwendung autologer Zellen wünschenswert.

1.2 Funktion und Struktur von hyalinem Gelenkknorpel

Gelenkknorpel hat die Aufgabe, Stöße zu absorbieren. Für diese Funktion ist er auf Grund seiner besonderen Gewebestruktur gut gerüstet. Sie beruht auf dem Prinzip eines faserverstärkten Werkstoffes. Auch wenn die auftretenden kompressiven Kräfte vorübergehend ausgesprochen hohe Werte erreichen (MUIR, 1995), wird in der Regel größerer Schaden vermieden, indem diese durch den Knorpel über die gesamte Gelenkoberfläche verteilt werden.

Der hyaline Knorpel enthält vor allem Glykosaminoglykane, Kollagen und Elastin neben Wasser als Hauptbestandteil. Auf Grund ihrer Fähigkeit zur Wassereinlagerung erzeugen die Glykosaminoglykane einen hohen osmotischen Innendruck, der von Kollagenfasern mit extrem hoher Zugbelastbarkeit kompensiert wird. Die notwendige

mechanische Festigkeit dieser Fasern resultiert aus der Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks der nur im hyalinen Knorpel im Verhältnis 8:1:1 vorkommenden Kollagentypen II, IX und XI. Die flüssige Wasser-Elektrolyt-Phase stellt für den avaskulären Knorpel den einzigen Weg zum Austausch von Nährstoffen und Metaboliten mit der Gelenkflüssigkeit dar (ARCHER et al., 1996, MOW & ROSENWASSER, 1988). Dabei wird die hohe Effektivität dieser Transportprozesse sowohl auf den hohen Wasseranteil wie auch auf die Pumpwirkung als Folge des sich intermittierend aufbauenden Drucks zurückgeführt, wie er unter typischer Belastung des Bewegungsapparates auftritt.

Die mechanischen Eigenschaften der Knorpelmatrix werden gewährleistet durch die Stoffwechselleistung der eingelagerten Chondrozyten, die zu deren Steuerung chemische und mechanische Signale aus der Matrix nutzen (BUCKWALTER & MANKIN, 1998).

1.3 Folgen der Gelenkknorpelverletzung

Wird die Belastungsschwelle des Gelenkknorpels für repetitiven mechanischen Stress häufig überschritten, kommt es in der Gelenkoberfläche zu Gewebeschäden und langfristig zur Knorpeldegeneration. Als Folge der Zunahme intensiver Sportarten erlebt man die Arthrose heute nicht erst im fortgeschrittenen Alter, sondern auch schon bei jungen Patienten.

Zur Erklärung dieses Phänomens ging man von einer generellen Unfähigkeit der Reparatur des Gelenkknorpels aus. Als Grund dafür wurde die avaskuläre und aneurale Struktur des Knorpels genannt (MANKIN, 1994), das hatten frühe histologische Untersuchungen gezeigt (DEPALMA et al., 1966, GHADIALLY et al., 1977, MANKIN, 1974).

Tatsächlich nimmt Knorpel nach einer Verletzung aber reproduzierbare physiologische Reparaturen auf. Blut tritt aus dem Markraum in die Läsion ein und füllt sie mit einem Fibringerinnsel. Multipotente mesenchymale Stammzellen wandern vom Knochenmark her ein und durchsetzen das Fibringerinnsel, welches resorbiert und durch die mesenchymalen Zellen ersetzt wird (SHAPIRO et al., 1993). Die Zellen differenzieren zu

Chondrozyten und produzieren Proteoglykane (ALTMAN et al., 1992, MANKIN, 1974). Die Läsion wird so mit Reparatursgewebe aufgefüllt, dessen Aufbau nach der intensiven Proteoglykansynthese äußerlich eine gewisse Ähnlichkeit mit dem des ursprünglichen, hyalinen Knorpels aufweist. Allerdings handelt es sich dabei um mechanisch minderwertigen Faserknorpel. Dieser entsteht, weil an Stelle des Kollagentyps II Kollagen vom Typ I zur Bildung eindimensionaler Fasern synthetisiert wird (BUCKWALTER & LOHMANDER, 1994, BULLOUGH, 1992, HOWELL, 1986, HUNZIKER, 1992, O'DRISCOLL, 1998, SCHILLER, 1995).

Diese Beobachtungen erklären den beschleunigten Verschleiß des Gelenkknorpels. Es kommt zu einem irreversiblen Abbau von Kollagenfaserbündeln. Die Knorpelzellen reagieren auf den Verlust der Matrixbestandteile mit einer vermehrten Zellproliferation, gefolgt von einer kompensatorischen Überproduktion von Baustoffen im Sinne einer versuchten Reparatur. Nach einer Phase, die durch ein Gleichgewicht von Matrixaufbau und -abbau gekennzeichnet ist, kommt es zur Dekompensation der frustranen Reparaturversuche. Es tritt ein Verlust aller Knorpelbestandteile ein, die Knorpeldicke nimmt stetig ab, bis der subchondrale Knochen zum Vorschein kommt (HÄUSELMANN & HUNZIKER, 1997).

Der Reparaturmechanismus, den SHAPIRO 1993 beschreibt, ist offensichtlich nichts anderes als eine Vernarbung (*scarring*), die im Knorpel in ähnlicher Weise abläuft wie auch in vielen anderen Geweben. Von Herz- und Lebergewebe ist seit langem bekannt, wie gut *scarring* funktioniert. Trotz Fettleber oder Herzinfarkt ist ein Weiterarbeiten der Organe, wenn auch mit verminderter Leistung, und ein relativ beschwerdearmes Leben möglich. Mutmaßlich hat sich die *scarring*-Reaktion in der Evolution als erfolgreicher erwiesen, weil sie schneller funktioniert als die funktionelle Wiederherstellung des Gewebes. Begriffe wie „Reparatur“ und „funktionelle Wiederherstellung“ von Knorpel müssen darum unterschieden und klar auseinandergehalten werden.

1.4 Operative Möglichkeiten bei Gelenkknorpelschäden

Zu den etablierten chirurgischen Behandlungsverfahren bei Gelenkknorpelschäden zählen derzeit eine Reihe von Verfahren mit unterschiedlichem operativen Aufwand.

Das arthroskopische Debridement mit Lavage kann helfen, mechanische und entzündliche Symptome zu lindern (BAUMGAERTNER et al., 1990, BERT, 1993, BUCKWALTER & LOHMANDER, 1994, KRUGER et al., 2000, RAND, 1991). Indem die subchondrale Gelenkfläche mittels multipler Bohrungen (RAE & NOBLE, 1989) zur Bildung von Ersatzgewebe stimuliert wird (NIETHARD & PFEIL, 1997), werden Knorpeldefekte mit dieser, nach Ihrem Erfinder benannten Technik behandelt (PRIDIE, 1959). Weitere Verfahren zur Eröffnung der subchondralen Platte stellen die Abrasionsarthoplastik (JOHNSON, 2001) und die Mikrofrakturierung (STEADMAN et al., 1999 und 2003) dar.

Als therapeutische Maßnahme mit der zur Zeit höchsten klinischen Erfolgsquote werden im Rahmen der osteochondralen Gelenkflächenimplantation (BOBIC, 1999, GARRETT, 1993) Knorpel-Knochen-Zylinder aus gesunden Gelenkarealen entnommen und in die Defektzonen transplantiert. Das Verfahren soll von dem Vorteil profitieren, funktionell intaktes, körpereigenes Gewebe zu nutzen, das den mechanischen Anforderungen lasttragender Implantate gerecht wird. Allerdings wird dieser Vorteil durch einen Entnahmedefekt mit gelenkschädigender Wirkung an anderer Stelle wieder eingeschränkt (MEENEN et al., 1998). Korrektur-Osteotomien werden benutzt, um die durch Arthrose verursachten Beschwerden zu lindern. Das Verfahren ist lediglich für junge Patienten reserviert, für die ein Gelenkersatz nicht in Frage kommt, die Entlastung ist postoperativ oft nur unvollständig und zeitlich limitiert (NEWMAN, 1998). Die Möglichkeit des künstlichen Gelenkersatzes als ultima ratio bei der Cox- oder Gonarthrose gilt als etablierte und evaluierte Therapiemöglichkeit (HÄUSELMANN & HUNZIKER, 1997).

Langfristig sind die Erfolgsaussichten der genannten Verfahren sehr begrenzt. Eine funktionelle Wiederherstellung des Knorpels wird mit diesen Techniken nicht erzielt. Sie führen aber mittelfristig zu einer subjektiven und objektiven Besserung der Symptome (MARTINEK & IMHOFF, 2003).

1.5 Alternative therapeutische Konzepte in der regenerativen Medizin

Soll die Wiederherstellung funktionell intakten hyalinen Knorpels gelingen, müssen die Nachteile der Reparatur mit minderwertigem Faserknorpel vermieden werden. Die

meisten Anstrengungen konzentrieren sich dabei auf die Korrektur vermuteter physiologischer Defizite des Knorpels. So wird im avaskulären Aufbau des Knorpels (MANKIN, 1982) wie auch in der offensichtlichen Unfähigkeit der Chondrozyten, sich aus angrenzendem gesunden Knorpel in Richtung einer Verletzung zu bewegen (NEWMAN, 1998), ein solcher Mangel gesehen. Unter Berücksichtigung dieser Thesen verfolgen neuere Modelle daher das Ziel, Chondrogenese-kompetente Zellen direkt in den Defekt einzubringen.

Entsprechende Konzepte sind beispielsweise die Transplantation von Perichondrium (COUTTS et al., 1992), Periost (MORAN et al., 1992) und mesenchymalen Stammzellen (WAKITANI et al., 1989). Hydroxylapatitkeramik (IYODA et al., 1993, MEENEN et al., 1993), Bioabbaubare Matrizen und Kollagen-Gele werden als Träger für Chondrozyten oder Wachstumsfaktoren benutzt (FRENKEL et al., 1997, FREED et al., 1994, PETERSEN, 2001, ROBINSON et al., 1990, SILAS, 1989), biologische Adhäsive entwickelt, um eine Bindung zwischen nativem Gewebe und implantierten Material zu erleichtern (HENDRICKSON et al., 1994, ITALY et al., 1987).

Schon früh gab es Überlegungen, die Möglichkeit der Expansion von Chondrozyten aus nicht-essentiellen Knorpelbereichen zu nutzen (GREEN, 1977). Später wurde auf ein mögliches Verfahren, Knorpelschäden durch Transplantation *in vitro* kultivierter Chondrozyten zu therapieren, hingewiesen (SOLURSH, 1991). Bei der Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT) werden Knorpelzellen aus Biopsien zunächst *in vitro* vermehrt und anschließend mit Hilfe eines Periostlappens im Gelenkniveau lokalisiert (BRITTBERG et al., 1994, LÖHNERT, 1998, MESSNER, 1999, RUDERT & WIRTH, 1997). Diesem Konzept liegt die Annahme zu Grunde, die implantierten Zellen würden durch Faktoren des Milieus zur Synthese hyalinen Knorpels angeregt. Spätere Beobachtungen zeigten auch bei dieser Technik das Einsetzen der *scarring*-Reaktion (BRITTBERG et al., 1997, GILLQUIST & MESSNER, 1997).

Allen bisher entwickelten Verfahren ist der Nachteil gemeinsam, dass die Qualität des Knorpels *in situ* nicht mehr beeinflusst werden kann. Wenn ein Verfahren zur Knorpelwiederherstellung die negativen Folgen der *scarring*-Reaktion vermeiden soll, ist ein alternatives Konzept gefragt, das neben der *in vitro* Proliferation der Zellen auch die extrakorporale Bildung eines hyalinen Knorpelgewebes ermöglicht.

1.6 Differenzierung von Chondrozyten

Mit dem Alter des Organismus verändert sich die Rate der metabolischen Aktivität von Chondrozyten und damit auch ihre Fähigkeit, auf unterschiedliche Belastungen adäquat zu reagieren (CHESTERMAN & SMITH, 1968). Die Aktivität adulter Chondrozyten nimmt ab und die Zellen teilen sich unter normalen Umständen nur selten (BUCKWALTER & MANKIN, 1998, MANKIN, 1982, STOCKWELL, 1967). Allerdings konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die extrakorporale Züchtung hyalinen Knorpels mit Hilfe isolierter adulter Chondrozyten prinzipiell möglich ist (THONAR & SWEET, 1981). Um diese Entdeckung aber therapeutisch nutzen zu können, mussten zunächst zwei Hindernisse überwunden werden: Die Gefahr der terminalen Differenzierung und der Verlust des differenzierten Phänotyps.

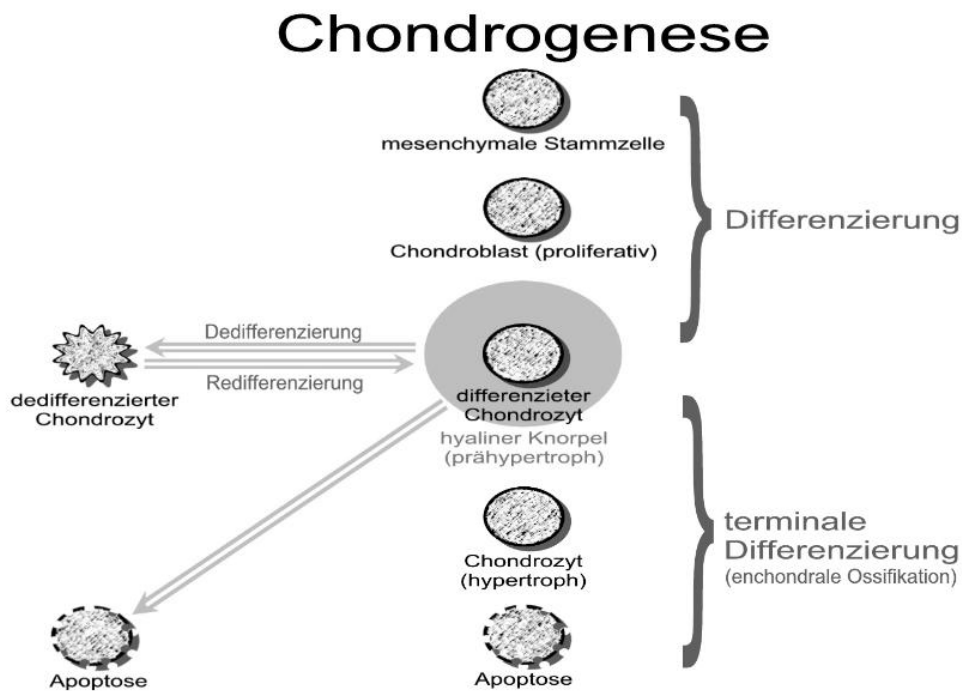


Abb. A: Differenzierungswege des Chondrozyten

Wie die obige Abbildung verdeutlicht, können die im Rahmen der embryonalen Chondrogenese gebildeten Chondrozyten unterschiedlichen Schicksalen unterliegen. Im Gelenkknorpel existieren nur differenzierte Zellen, die nicht hypertrophieren (ARCHER et al., 1994, GIBSON et al., 1997). Alternativ können Chondrozyten auch terminal differenzieren bevor sie durch Apoptose sterben. In dieser Variante unterstützen sie durch Knorpelexpansion und geordnete Resorption den Mechanismus der enchondralen

Ossifikation (REDDI & CUNNINGHAM, 1991). Für die Möglichkeit, artikuläre Chondrozyten zur Regenerierung kondylärer Defekte im Skelett einzusetzen (CAPLAN et al., 1997), ist die Beobachtung der spontanen Hypertrophierung frisch isolierter *in vitro* kultivierter Chondrozyten sicher ein Vorteil (CAPLAN, 1987). Aus der Sicht des Vorhabens der *in vitro* Herstellung dauerhafter Knorpelimplantate sind hier noch einige Probleme zu lösen. So werden für die bisherigen Misserfolge aktueller Therapiekonzepte wie der ACT (BRITTBERG et al., 1994, SAMS & NIXON, 1995) unter anderem der Verlust von Chondrozyten durch Apoptose als Folge einer hypertrophen Differenzierung verantwortlich gemacht. Daher wird gefordert, sich eingehend mit der Prävention der Chondrozytenhypertrophie und der Inhibierung der Apoptose hypertropher Chondrozyten zu befassen (GIBSON et al., 1997).

Anderen Autoren gelingt es zwar, primäre Chondrozyten längere Zeit unter Erhalt ihres differenzierten Status *in vitro* zu kultivieren und so deren Potenzial zur Chondrogenese zu bewahren (KIM et al., 1994). Doch appliziert man die für die notwendige Zellvermehrung geeigneten mitogenen Wachstumsbedingungen, dedifferenzieren die Zellen *in vitro*. Dedifferenzierte Chondrozyten produzieren anstatt des für hyalinen Knorpel spezifischen Kollagentyps II jedoch den Typ I und sind daher nicht verwendbar (BUJIA et al., 1990, CASTAGNOLA et al., 1986 und 1988).

Solange das Phänomen der Dedifferenzierung experimentell nicht zu vermeiden ist, bleibt deren Umkehrung zur Wiederherstellung des differenzierten Phänotyps wichtigstes Ziel. Ob dieser Prozess, der in der Literatur mit dem Begriff der Redifferenzierung beschrieben wird, in befriedigendem Ausmaß gelingt, ist bisher nicht erwiesen. Zwar finden sich zahlreiche Protokolle zur Redifferenzierung, die angeblich die Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglykanen unterstützen (AULHOUSE, 1994, BENYA & SCHAFFER, 1982, SCHULZE-TANZIL et al., 2002), jedoch unterscheiden sich die Zellen experimentell noch deutlich hinsichtlich ihrer Syntheseleistung bei der *in vitro* Chondrogenese von primären Chondrozyten.

Neben der Induktion der Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten wird alternativ auch versucht den differenzierten Phänotyp durch Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu erreichen (HUNZIKER & ROSENBERG, 1996).

1.7 Ursachen der Dedifferenzierung und Möglichkeiten zur Redifferenzierung

Die Entwicklung eines eigenen Konzepts zur experimentellen Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten geht von folgenden Überlegungen aus: Für die Zellen eines Organismus gilt prinzipiell, dass sich das Verhalten des differenzierten Phänotyps durch seine direkte Umgebung einschließlich der Nachbarzellen definiert. Dieses Prinzip funktioniert auch im hyalinen Knorpel mit nur einem Zelltyp, der gleichermaßen als Geber und Empfänger von extrazellulären Signalen fungiert. Die einzelnen Signale, die in ihrer Gesamtheit dafür verantwortlich sind, welches genetisches Programm aktiviert wird - Proliferation, Matrixproduktion, Differenzierung, *scarring*-Reaktion, Adhäsion oder Migration - erreichen die Zelle prinzipiell über drei verschiedene Ebenen: 1) durch lösliche (endokrine und parakrine) Faktoren, 2) durch Zell-Zell-Kontakte und 3) durch Zell-Matrix-Kontakte.

Bei der Isolierung primärer Chondrozyten aus ihrer natürlichen Umgebung verlieren die Zellen praktisch alle diese Signale, die sie aus der Knorpelmatrix unter normalen Umständen erhalten. In diesem Verlust muss die eigentliche Ursache für die Veränderung des Funktionszustandes der Chondrozyten gesehen werden. Experimentelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass Chondrozyten allein zum Überleben ein Minimum an parakrinen Signalen benötigen. Andernfalls wird ein intrinsisches Programm mit dem Ziel des Zelltods durch Apoptose eingeleitet (KERR et al., 1972, WYLLIE et al., 1980). Es wurde gezeigt, dass isolierte Chondrozyten in Kultur bei geringer Zelldichte nur vor dem Zelltod bewahrt werden können, wenn sie Signale aus konditioniertem Medium von *high density*-Kulturen erhalten (ISHIZAKI et al., 1994). Im Versuch konnte dieser Effekt durch Zugabe von Kälberserum oder einer Kombination bestimmter Wachstumsfaktoren (EGF und bFGF) simuliert werden.

An der spezifischen Adhäsion zwischen Zellen untereinander oder von Zellen an festen Oberflächen sind bestimmte Zellmembran-Proteine beteiligt. Als Beispiel dafür seien die in der Plasmamembran vieler Zelltypen nachgewiesenen Integrine mit hoher Affinität für Liganden des Bindegewebes wie Laminin, Fibronectin, und Kollagen genannt. Über Chondrozyten ist darüber hinaus bekannt, dass sie bei Interaktion mit Kollagen Typ II im differenzierten Zustand stabilisiert werden (WAKITANI et al., 1989). Bei der Adhäsion an künstlichen Oberflächen wie dem Polystyrol der Zellkulturgefäße

werden bei den meisten Zellen offensichtlich Liganden solcher Integrine simuliert, die mitogene Signale vermitteln. Im Falle der isolierten Chondrozyten ist damit offensichtlich gleichzeitig die Abschaltung wesentlicher Funktionen des differenzierten Phänotyps gekoppelt so, dass diese Zellen während der *in vitro* Proliferation in konventionellen Monolayer-Kulturen einer fortschreitenden Dedifferenzierung unterliegen. Umgekehrt ist so auch verständlich, dass sich der differenzierte Phänotyp durch Ausschluss mitogener Signale zum Beispiel bei Kultivierung auf Agarose beschichteten Kulturgefäßen monatelang konservieren lässt (HÄUSELMANN et al., 1994).

Am Beispiel von Chondrozyten aus Epiphysenfugen konnte gezeigt werden, dass Zell-Zell-Kontakte zu einer spezifischen Zellkondensation mit starken chondrogenen Signalen führen (TACCHETTI et al., 1992). Es ist daher naheliegend, dass Zell-Zell-Kontakte die Chondrogenese auch in Chondrozyten aus der Gelenkfläche stimulieren.

1.8 Problemstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Aus klinischer Sicht besteht heute der dringende Bedarf an der *in vitro* Herstellung eines funktionsfähigen dreidimensionalen Knorpel-Implantates, das mit dem Ziel einer echten Reparatur zur Behandlung von Gelenkflächenschäden eingesetzt werden kann. Zur Vermeidung immunologischer Probleme kommen allerdings nur autologe Zellen des Patienten in Frage. Zur Zeit stehen zu deren Isolierung aus einer Biopsie und Vermehrung *in vitro* jedoch nur Protokolle zur Verfügung, die zu einem Verlust des ursprünglichen differenzierten Phänotyps der so gewonnenen Zellen führen.

In diesem Zusammenhang sollte mit der vorliegenden Arbeit experimentell überprüft werden, in wieweit sich die infolge einer *in vitro* Expansion weitgehend dedifferenzierten Chondrozyten noch zur Bildung eines dreidimensionalen hyalinen Knorpelgewebes eignen. Als Arbeitshypothese sollte von der Möglichkeit ausgegangen werden, direkte Zell-Zell-Kontakte zur partiellen Redifferenzierung zu nutzen. Im einzelnen war dazu eine Technik zu entwickeln, die es ermöglicht, unter Verzicht auf formgebende Polymervliese allein mit Hilfe von *high density*-Kulturen Knorpelgewebe in präparativem Maßstab herzustellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Knorpelspender

- Minipig, 24 Monate, ca. 40 kg (Ellegaard Göttingen Minipigs Aps., Dalmose, Dänemark)

2.1.2 Instrumente

- Blottkammer (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Brutschrank, Typ BB6220 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland)
- Digestionsapparatur nach Green
- Elektrophoresekammer (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Ethylenoxid-Sterilisator (DMB Apparatebau, Wörrstadt, Deutschland)
- Heizblock, Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Lichtmikroskop, Typ BH-2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Mikrotom, Typ Histoslide 2000, Leica Microsystems Nussloch, Wetzlar, Deutschland)
- Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Phasenkontrastmikroskop, Typ CK-2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Photometer, Typ Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac Distribution, Freiburg, Deutschland)
- Reinstwasseranlage, Seralpur Pro 90 (Seral, Ransbach-Baumbach, Deutschland)
- Sterilbank, Typ Biohazard (M.D.H. InterMed, Andover, England)
- Waage, Typ PM 460 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland)
- Zentrifuge Typ Varifuge 3,0 R (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

- Blotmembran, Typ TransBlot PVDF (0,2µm) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Dialysemembran (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
- Einmal-Skalpelle, Gr. 15 (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Gewebekulturflaschen, 650 ml (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Gewebekulturplatten, 6er (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Mikrotiterplatten, 96-well (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Objektträger, Histobond (P. Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Probenröhrchen, 50 ml, Typ Blue Boy (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Sterilfilter, Porengröße 45 µm (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

2.1.4 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol (C₂H₆OS) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- α-Ketoglutarat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Acrylamidlösung (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Alkalische Phosphatase, Streptavidin-markiert (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA)
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Anti-Kollagen I von der Ziege (Southern Biotech. Ass., Birmingham, USA)
- Anti-Kollagen II von der Ziege (Southern Biotech. Ass., Birmingham, USA)
- *Aqua dest.*, hergestellt mit Seralpur Pro 90
- Bisbenzimid (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland)
- Chondroitinsulfat C aus Haifischknorpel (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Dichlorphenolindophenol-Natrium (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Diethanolamin (Tropix, Bedford, USA)

- Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Dimethylmethylenblauschlorid (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Dithiotreitol (DTT) (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland)
- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
- Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Eosin, 1%ig (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure, 10%g (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Eukitt-Kunsthartz (Honeywell, Seelze, Deutschland)
- Foetales Kälberserum (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Guanidiniumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Hämalun (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- HCl-Alkohol 1%ig
- Hyaluronidase III (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- I-Block (Casein) (Tropix, Bedford, USA)
- Jodacetamid (JAA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Kollagen-Standard Typ I (Southern Biotech. Ass., Birmingham, USA)
- Kollagen-Standard Typ II (Southern Biotech. Ass., Birmingham, USA)
- Kollagenase Ia (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- L-Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- L-Cystein (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methylbenzoat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methylrot 2%, (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- N-Acetyl-L-cystein (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

- Naphthylethylendiamine-Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (NaH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Original DT-DNA aus Kalbsthymus (Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland)
- Papain (Boehringer Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland)
- Paraffin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Phenylmethylsulfonfluorid (PMSF) (F. Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
- Phosphorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Pikrinsäure (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- p-Nitrotetrazolium-Blau (NBT), 50mg/ml (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- Rabbit Anti Goat IgG (Southern Biotech. Ass., Birmingham, USA)
- Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor (basic-FGF) (Genzyme Corporation, Cambridge, USA)
- Recombinant Human Epidermal Growth Factor (EGF) (Genzyme Corporation, Cambridge, USA)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Sodium Bicarbonate 7,5% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
- Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Trypsin/EDTA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
- Tween 20 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland)
- Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.5 Ansätze

- Ansatz-Puffer
2M NaCl + 15mM Natrium-citrat, pH 7,0 + 1 $\mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid
- Blocking-Puffer

0,5 % Casein [I-Block] + 0,1 % Tween 20 in PBS + 0,02 % Natriumazid in *Aqua dest.*

- Bouin-Gemisch
15 Teile Pikrinsäure, 5 Teile Formalin und 1 Teil Eisessig
- Elektrophorese-Probenpuffer
6M Harnstoff/0,1M PMSF/5mM JAA/0,6% Essigsäure (250 ml: 90 g Harnstoff in 0,6 % Essigsäure + 2,5 ml 0,1 M PMSF + 230 mg Jodacetamid/ml DMSO)
- GAG-Farbstoff
Lösung A: 78mM Dimethylmethylenblauchlorid in 50 ml *Aqua dest.* +
Lösung B: 16,15 ml 1M HCl + 2,584 g Glycin + 2,015 g NaCl in 500 ml *Aqua dest.*
- Gries-Reagenz
1 Teil 2% Sulfanilamid in 5% H₃PO₄ + 1 Teil 0,2% Naphthylethylendiamine-Dihydrochlorid in H₂O
- Medium
500 ml DMEM + 50 ml Foetales Kälberserum + 40 mg α-Ketoglutarat in 8 ml Natrium Bicarbonat 7,5%
- Mini-Gele
Nach Abgießen der Essigsäure vom Trenngel wird das Sammelgel darüber gegeben.
- Papain-Lösung
500 µl 0,1M NaH₂PO₄/0,005M EDTA pH 6,5 + 5 µl Mercaptoethanol + 2,5 µl Papain {10 mg/ml Stammlösung}
- Sammelgele
316 µl/ml 10M Harnstoff + 134 µl/ml *Aqua dest.* + 3 µl/ml Eisessig + 40 µl/ml 50% Acrylamidlösung + 3,5 µl/ml 10% APS + 3,5% TEMED
- Substratlösung für Alkalische Phosphatase
66 µl NBT in 70 % Dimethylformamid + 33 µl BCIP in 100% Dimethylformamid in Substratpuffer
- Substratpuffer für Alkalische Phosphatase
0,1 M Diethanolamin, pH 10 + 1 mM Magnesiumchlorid + 0,02 % Natriumazid
- Tillmanns Reagenz
2mg Dichlorphenolindophenol-Natrium/ 50 ml H₂O

- Trenngele
10M Harnstoff (60/ml) + Auqua dest. (1,75 ml) + Eisessig (7/ml) + 50% Acrylamidlösung (14ml) + 3,5 µl/ml 10% APS + 7,5 µl/ml TEMED. Zur Glättung der Oberfläche 5 µl/ml 0,6% Essigsäure
- Verdünnungs-Puffer
2,5M NaCl + 18,75mM Na-Citrat, pH 7,0 + 1,25 µg/ml Bisbenzimid {1 ng/ml Stammlösung}
- Waschpuffer
0,2 % Casein + 0,1 % Tween 20 in PBS + 0,02 % Natriumazid in *Aqua dest.*

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Gelenkknorpel-Chondrozyten

Unter sterilen Bedingungen wurde aus den Knie- und Ellenbogengelenken von Minipigs post mortem Gelenkknorpel in Form von kleinen Chips gewonnen, die mit Skalpell von der Gelenkoberfläche abgetragen und in PBS gewaschen wurden. Unter der Sterilbank wurde das so gewonnene Gewebe anschließend mit dem Skalpell zerkleinert und in die Verdauungskammer der Digestionsapparatur gegeben.

In fünf aufeinander folgenden Verdauungsschritten wurde die jeweilige Lösung in die Verdauungskammer mit den Knorpelstückchen gegeben und die Suspension bei 37°C und 5% CO₂-Konditionierung unter Gebrauch eines Magnetrührers bei 200 U/min im Brutschrank inkubiert.

1	25 mg Hyaluronidase in 50 ml PBS	25 Min.
2	50 ml Trypsin/EDTA	45 Min.
3	50 ml DMEM	5 Min.
4	25 mg Kollagenase in 10 ml PBS und 40 ml Medium	120 Min.
5	25 mg Kollagenase in 10 ml PBS und 40 ml Medium	120 Min.

Nach verschiedenen Verdauungszeiten wurde die Lösung anschließend abgesaugt und bei 2000 U/min für 5 Minuten in 50 ml-Probenröhrchen zentrifugiert. Nach Absaugen

des Überstandes konnten die so gewonnenen Chondrozyten in 50 ml Medium suspendiert und bei 37°C inkubiert werden.

2.2.2 Proliferation von Gelenkknorpel-Chondrozyten

Nach der Isolierung wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen ausgesät und in 25 ml Medium inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen nach dem folgenden Protokoll trypsiniert:

Absaugen und Verwerfen des alten Mediums, dabei bleiben die Zellen fest am Boden der Kulturflaschen haften.
Spülung mit 8 ml PBS, Absaugen und Verwerfen des PBS.
Benetzen des gesamten Flaschenbodens mit 6 ml Trypsin/EDTA und Inkubation für 5 Minuten.
Kräftiges Beklopfen der Kulturflasche zum Lösen sämtlicher Zellen.
Neutralisierung des Trypsins mit 10 ml Medium.
Verteilung der Suspension zu gleichen Teilen auf zwei neue Kulturflaschen und Auffüllen des Volumens auf jeweils 25 ml Medium.
Zusatz von basic-FGF (10 ng/ml) und EGF (1 ng/ml).
Erneute Inkubation für drei Tage.

2.2.3 Verfahren der Chondrozyten-Aggregation

2.2.3.1 *Sedimentations-Methode*

Die mittels Trypsinierung gewonnene Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Die Chondrozyten wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen, z.B. 4 Mio. Zellen in 200 µl Medium erneut in Suspension gebracht. Diese 200 µl Zell/Medium-Suspensionen

wurden jeweils in ein Well einer mit 1% Agarose beschichteten, schräg gestellten 6er-Gewebekulturplatte (Abb. B) gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Aggregation vorsichtig mit 3,8 ml Medium überschichtet und für weitere zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kulturplatten mit den Pellets wieder waagrecht gelagert und weiter inkubiert. Mediumwechsel und die Entnahme von Mediumproben erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, alle zwei Tage. Variationen in der Versuchsdurchführung werden im Teil „Ergebnisse“ näher beschrieben.



Abb. B: 6er-Gewebekulturplatten, schräg gestellt

2.2.3.2 Zentrifugations-Methode

Die Zellgewinnung erfolgte ebenfalls mittels Trypsinierung. Die Zellen wurden bei der Methode der Zentrifugation normalerweise in einer Konzentration von 4 Mio. Zellen in 4 ml Medium suspendiert. Diese Suspensionen wurden jeweils in einem mit Agarose beschichteten 50 ml-Blue Boy bei 600 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Nach vier Tagen wurden die Pellets in Agarose beschichtete 6er-Kulturplatten umgesetzt.

Mit dieser Methode gelang es, Pellets aus bis zu 26 Mio. Zellen in einem 50ml-Blue Boy herzustellen (Abb. C). Wie das Beispiel zeigt, entstanden daraus bei täglichem Mediumwechsel nach 14 Tagen Inkubation Knorpelstücke von einer Größe von über einem Zentimeter Durchmesser.

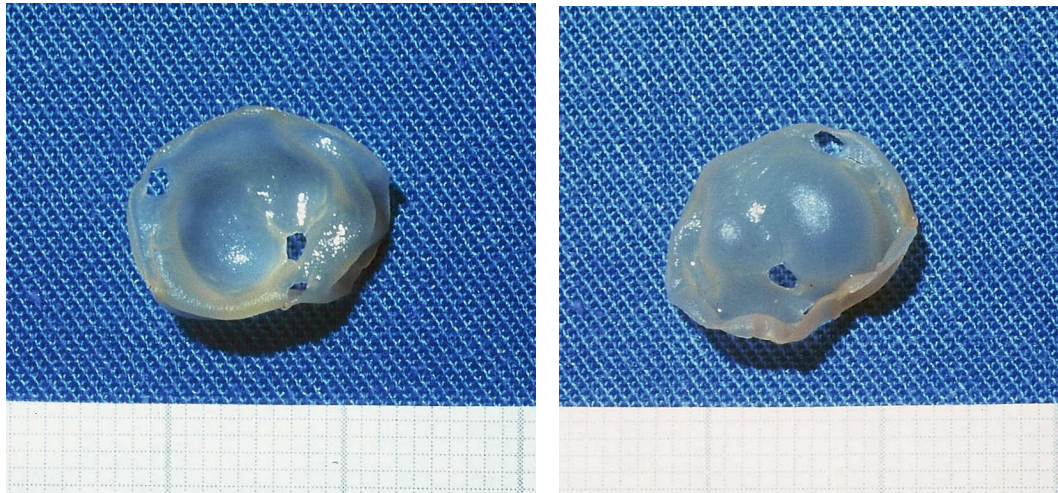


Abb. C: 2 Wochen altes Pellet aus 26 Mio. Zellen, Vorder- und Rückseite

2.2.4 Analytik

2.2.4.1 Zellzahlbestimmung

Die Zählung der Chondrozyten erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Dazu wurde ein Phasenkontrastmikroskop mit 10facher Vergrößerung benutzt.

2.2.4.2 Ascorbinsäure-Messung

Ascorbinsäure wurde oxidimetrisch mit Tillmanns Reagenz bestimmt. Bei der Oxidation der Ascorbinsäure geht der Farbstoff (blau in neutraler Lösung) in die reduzierte farblose Diphenylaminverbindung über. Für die Bestimmung der Ascorbinsäure wurde das Medium mit Essigsäure angesäuert. Dadurch war die Ascorbinsäure besser gegen Oxidation durch Luftsauerstoff geschützt. Der Test erfolgte mit einer Eichreihe von je 100 μ l Medium ohne Ascorbinsäure und mit je 1, 2, 3, 4 und 5 μ g Ascorbinsäure sowie je 10 μ l 100%ige Essigsäure. Anschließend wurde Tillmanns Reagenz in 10 μ l Stufen bis zur Rosafärbung zu pipettiert.

2.2.4.3 DNA-Bestimmung (nach KIM et al., 1988)

Der DNA-Gehalt der Pellets wurde nach dem folgenden Protokoll bestimmt:

Knorpel-Pellets über Nacht bei 60°C im Heizblock in jeweils 500 µl Papain-Lösung unter Schütteln inkubieren.
50 µl der verdauten Probe werden mit 200 µl Verdünnungs-Puffer versetzt und zentrifugiert.
100 µl Überstand werden in Reihe A einer Mikrotiterplatte pipettiert (Verdünnungsfaktor: 50). Jede Probe wird doppelt bestimmt.
Standard: 50 µl DT-DNA (25 µg/ml) werden mit 200 µl Verdünnungs-Puffer versetzt und davon je 100 µl in Reihe A pipettiert.
Vorgabe von 100 µl Ansatz-Puffer in alle Reihen.
1:2 Verdünnung in die folgenden Reihen der Mikrotiterplatte

Die fluorometrische Messung am Photometer beinhaltet eine Anregung bei 355 nm und die Extensionsmessung bei 460 nm. Die Messwerte wurden in einer Excel-Datei ausgegeben und mit Hilfe einer Regressionsanalyse (Excel-Makro; Adamietz) ausgewertet.

2.2.4.4 Bestimmung von Glykosaminoglykanen (nach FARNDALÉ et al., 1986)

Der Detektion von Proteoglykanen dient ein photometrischer Assay von Chondroitinsulfat bei einer Wellenlänge von 530 nm. Alle Proben werden doppelt bestimmt. Die Auswertung erfolgt wie bei der DNA-Bestimmung mittels Regressionsanalyse.

2.2.4.4.1 Messung im Medium

100 µl Standard (500 ng/ml Chondroitinsulfat in Medium) und Mediumproben in Reihe A einer Mikrotiterplatte pipettieren.
Für die Verdünnungsreihe alle Zellen mit 100 µl H ₂ O beschicken und 1:2 verdünnen.

Zugabe von je 150 µl GAG-Farbstoff
Messung nach 30 Sekunden.

2.2.4.4.2 Messung im Pellet

Pellets über Nacht bei 60°C in 500 µl Papain-Lösung inkubiert.
50 µl Probe in Reihe A einer Mikrotiterplatte pipettieren.
Vorgabe von 150 µl H ₂ O für Reihe A und 100 µl H ₂ O für die übrigen Verdünnungsreihen.
100 µl des Standards (500 ng/ml Chondroitinsulfat) in Reihe A der Mikrotiterplatte pipettieren.
Zugabe von je 150 µl GAG-Farbstoff
Messung nach 30 Sekunden.

2.2.4.5 Immunoblot-Analyse zum semiquantitativen Nachweis von Kollagen

Die bestimmung des Kollagengehalts erfolgte nach der folgenden Vorschrift mit Hilfe von Westernblots:

Lysieren der Pellets in 500 µl 6M Guanidinhydrochlorid (in 0,2M Tris pH 8,5) bei 60°C	120 Min.
Abzentrifugieren des unlöslichen Restes	
Inkubation in 50 µl 0,5M DTT bei 60°C	30 Min.
Zugabe von 50 µl Essigsäure (10%) und JAA-Lösung (0,1 M Jodacetamid)	

Dialyse von 100 µl je Probe gegen Elektrophorese-Probenpuffer	60 Min.
Zugabe von 10 µl Methylrot	
Vorlauf d. Mini-Gele in 0,6 % Essigsäure bei 100V	60 Min.
je 10 µl Probe und Kollagen-Standards in die Taschen der Mini-Gele	
Elektrophorese bei 100 V	30 Min.
Elektrophorese bei 200 V	150 Min.
Blotten bei 80 V in 0,6% Essigsäure	60 Min.
Waschen in PBS	5 Min.
Inkubation in Blocking-Puffer	60 Min.
Inkubation mit primären AK Anti-Kollagen I- bzw. II-Antikörpern (1:1000) bei 8°C	über Nacht
zweifach in Waschpuffer	je 5 Min.
Inkubation mit sekundärem AK Rabbit Anti Goat IgG bei Raumtemperatur	30 Minuten
in Waschpuffer	5 Min.
Inkubation mit Alkalischer Phosphatase (AP)	30 Min.
dreifach in Waschpuffer, zweifach in Substratpuffer für Alkalische Phosphatase	je 5 Min.
Färbung mit 33 µl BCIP/66 µl NBT-Salz in Assay-Puffer	15 Min.
zweifach in <i>Aqua dest.</i> , trocknen	je 5 Min.

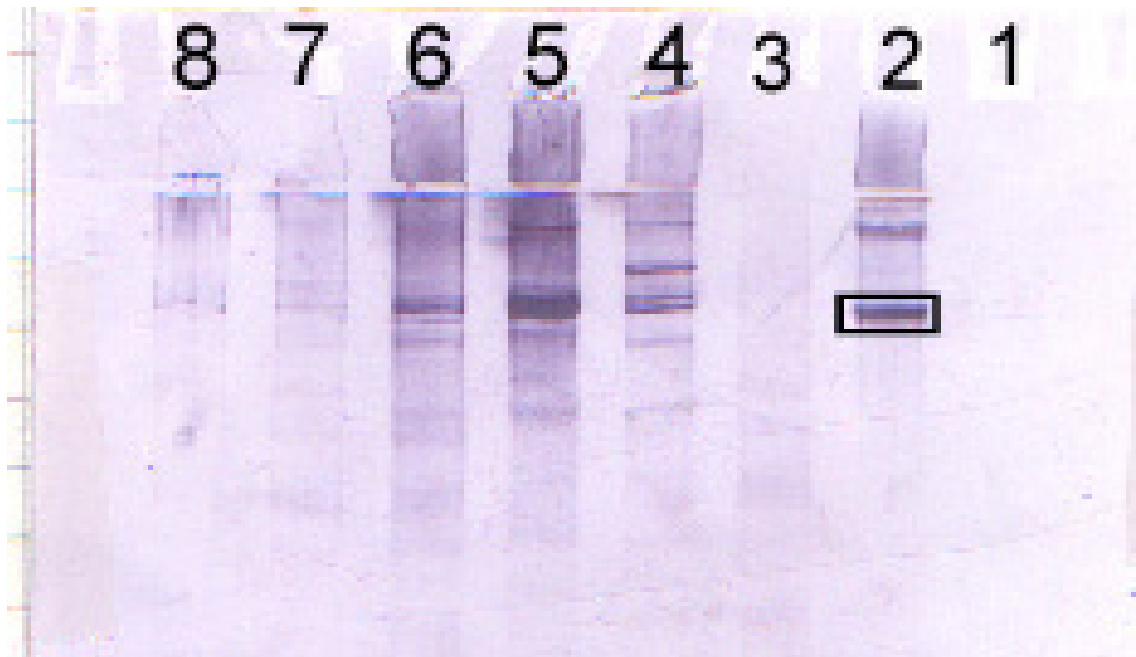


Abb. D: Bandenmuster eines Kollagenblots. Der Marker für Kollagen II (Reihe 2) zeigt die Hauptbande beim Kollagen-Monomer, darüber befindliche Banden kennzeichnen Di- und Multimere. Zur Kontrolle auf Kreuzreaktionen wurde der Kollagen Typ I-Marker (Reihe 1) mit aufgetragen

2.2.4.6 Bestimmung von Nitrit als Nachweis von Stickstoffmonoxid

Vorgabe von 100 µl NaNO ₂ -Standard (20 µM/l) in die Reihen A und B einer Mikrotiterplatte, jeweils doppelt bestimmt.
Gabe von 100 µl der zu bestimmenden Mediumproben in die Reihen A und B.
Verdünnungsreihe mit 100 µl H ₂ O ab Reihe B.
Gabe von je 100 µl Gries-Reagenz pro Well, Messung nach 10 Minuten bei 530 nm am Multilabel Counter.

Da das Leermedium ebenfalls Stickstoffmonoxid enthält, wurde es regelmäßig mitbestimmt.

2.2.4.7 Anfärbung von Knorpelschnitten mit Hämalaun-Eosin

Knorpel-Pellets wurden zur histologischen Aufarbeitung wie folgt behandelt:

in Formalin (4%)	48 Std.
in Bouin-Gemisch	1 Std.
in Ethanol (80%)	1 Std.
in Ethanol (90%, 96% und 100%)	je 30 Min.
in Methylbenzoat	24 Std.
dreimal in Paraffin (62°C)	24 Std.

Anschließend konnten die Pellets, in Paraffin gegossen, über Nacht aushärten und geschnitten werden.

Die folgenden Schritte beschreiben die Hämalaun-Eosin-Färbung:

in Xylol	15 Min.
in Ethanol (100%, 96%, 80% und 70%)	je 15 Min.
in <i>Aqua dest.</i>	15 Min.
in Hämalaun	5 Min.
in HCl-Alkohol (1%), bis zur Rosa-Färbung	kurz
in Hämalaun	20 Min.
in Eosin (1%)	5 Min.
in Ethanol (90%, 96% und 100%)	kurz
in Xylol	2 Min.
Zuletzt werden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.	

3. Ergebnisse

3.1 Zellvermehrung für die Chondrogenese durch optimale *in vitro* Proliferation

Die extrakorporale Bildung von Knorpelgewebe aus frisch isolierten primären Chondrozyten ist zwar schon an verschiedenen Tiermodellen demonstriert worden, doch lassen sich diese Ergebnisse nicht ohne weiteres reproduzieren, wenn die Zellen zur Vermehrung zuvor für einige Passagen *in vitro* kultiviert wurden. Einerseits reicht die aus einer Biopsie isolierbare geringe Zahl von Zellen zur Bildung eines Knorpelimplantats nicht aus, andererseits sind Bedingungen, die eine ausreichende Proliferation ohne partiellen Verlust des Phänotyps der Chondrozyten erlauben, zur Zeit noch nicht bekannt. Im Hinblick auf eine potentielle Nutzung der Ergebnisse der geplanten Untersuchungen erscheint es daher sinnvoll, sämtliche Experimente zur *in vitro* Synthese von Knorpelgewebe auch mit *in vitro* expandierten Chondrozyten durchzuführen, um von vornherein der Möglichkeit Rechnung zu tragen, dass sich die morphologisch sichtbaren Veränderungen der Chondrozyten als Folge der *in vitro* Kultivierung auch in einer reversiblen oder irreversiblen Veränderung zellulärer Funktionen niederschlagen.

Die zur Isolierung und zur *in vitro* Proliferation angewandten Methoden sind leicht modifizierte Varianten bereits beschriebener Verfahren. Sie wurden vor allem nach Kriterien der Effektivität und möglichst geringem Aufwand ausgewählt. Im wesentlichen handelt es sich um die Monolayer-Kulturtechnik mit dem Zusatz mitogener Wachstumsfaktoren wie bFGF und EGF. Ein typisches Ergebnis der Expansion von Schweinechondrozyten über sechs Passagen ist in der Abbildung 1 dargestellt. Sie zeigt, dass es unter den gegebenen Bedingungen gelingt, ausgehend von weniger als 1 Mio. Zellen in wenigen Wochen eine knapp 300-fache Vermehrung zu erreichen.

In Übereinstimmung mit früheren Berichten wird die erwartete morphologische Veränderung des Phänotyps in Abhängigkeit von der Dauer der *in vitro*-Kultivierung beobachtet. Die Zellen zeigen mehr und mehr eine fibroblastoide Morphologie, wie in Abbildung 2 zu erkennen ist.

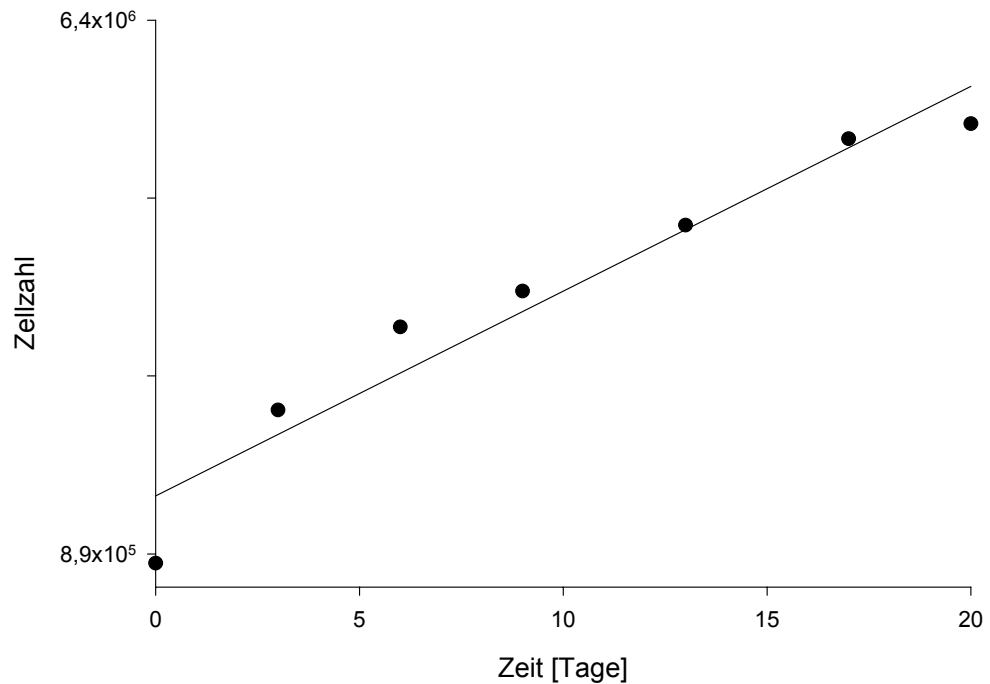


Abb. 1: Proliferation frisch isolierter Chondrozyten über 20 Tage in Monolayer-Kultur

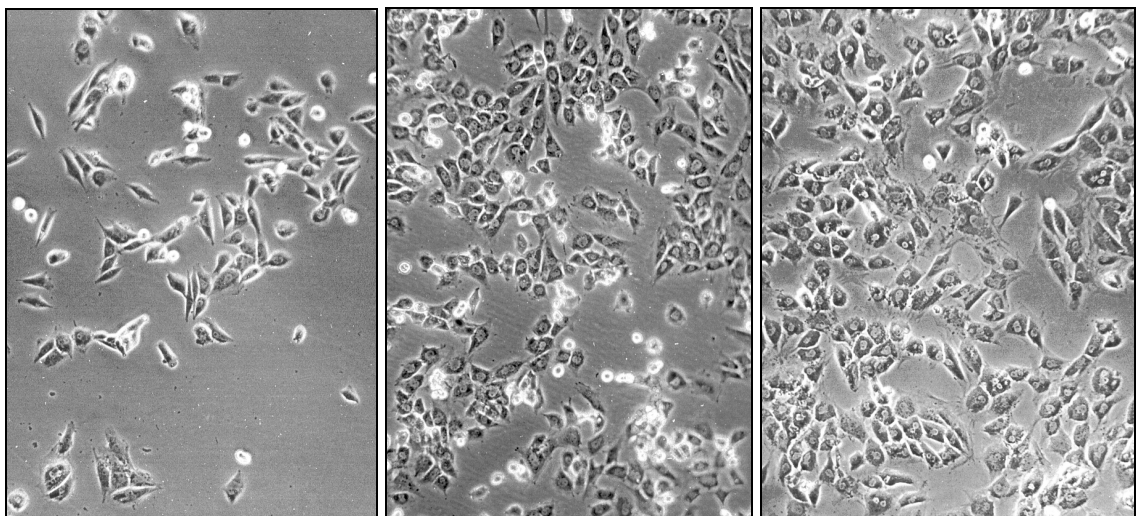


Abb. 2: Mikroskopische Betrachtung proliferierender Chondrozyten in Monolayer-Kultur, einen, zwei und vier Tage nach Aussaat; die höchste Zahl mitotischer (runder) Zellen beobachtet man nach zwei Tagen

In wie weit damit die Fähigkeit zur Knorpelsynthese vermindert wird und auf welchem Wege sie möglicherweise wieder hergestellt werden kann, soll durch die im folgenden beschriebenen Experimente gezeigt werden.

3.2 Chondrogenese durch Zell-Zell-Kontakte *in vitro* vermehrter Chondrozyten

Lassen sich Chondrozyten durch Adhäsion an die Oberflächen der Zellkulturgefäße in Gegenwart mitogener Wachstumsfaktoren (bFGF und EGF) sehr effektiv zur Proliferation stimulieren, so gelingt die Induktion ihrer zellspezifischen Syntheseleistungen durch Applikation sogenannter chondrogener Bedingungen unter gleichzeitiger Vermeidung der mitogenen Reize. Einer der wirkungsvollsten Wege zur Stimulierung der Knorpelbildung ist neben der Applikation chondrogener Wachstumsfaktoren der direkte Zell-Zell-Kontakt. Im konkreten experimentellen Ansatz sollte überprüft werden, ob diese Möglichkeit zur Stimulierung der Chondrogenese auch noch mit den *in vitro* vermehrten Zellen genutzt werden kann. Dabei sollen die notwendigen intensiven Zell-Zell-Kontakte durch Sedimentation der Zellen zu Zellpellets erreicht werden. Um gleichzeitig die Wirkung mitogener Reize auszuschließen, wird die Adhäsion der Zellen an die Oberflächen der Zellkulturgefäße durch Beschichtung mit Agarose vermieden und der Zusatz mitogener Wachstumsfaktoren weggelassen.

Da zu Beginn keine Erkenntnisse über die optimale Startzellzahl vorlagen, wurde das Experiment mit drei verschiedenen Zellmengen parallel durchgeführt. Von Chondrozyten, die für 9 Passagen *in vitro* vermehrt worden waren, wurden 4 x jeweils 1, 2 und 4 Mio Zellen separat sedimentiert, um anschließend zu einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml Wachstumsmedium resuspendiert zu werden. Unter diesen Bedingungen wurde den Zellen für 30 Minuten Gelegenheit zur Aggregation gegeben, bevor mit dem 10-fachen Volumen Wachstumsmedium überschichtet wurde. Da davon auszugehen war, dass die Zellen bei dieser hohen Dichte bald in eine Sauerstoffmangelsituation kommen würden, musste die Inkubationszeit zur Aggregation bis zum Überschichten mit frischem Medium einerseits möglichst kurz gehalten werden, andererseits durfte dieser Zeitraum nicht zu kurz sein, um die Gefahr der Desaggregation während des Überschichtungsvorgangs zu vermeiden. Nach 14 Tagen Inkubation wurden die gebildeten Pellets entnommen und auf ihren Gehalt an DNA und Glykosaminoglykanen (GAG) (Abb. 3) untersucht. Zusätzlich wurde die Konzentration an GAG auch in dem alle zwei Tage ausgetauschten Kulturmedium (Abb. 4) bestimmt.

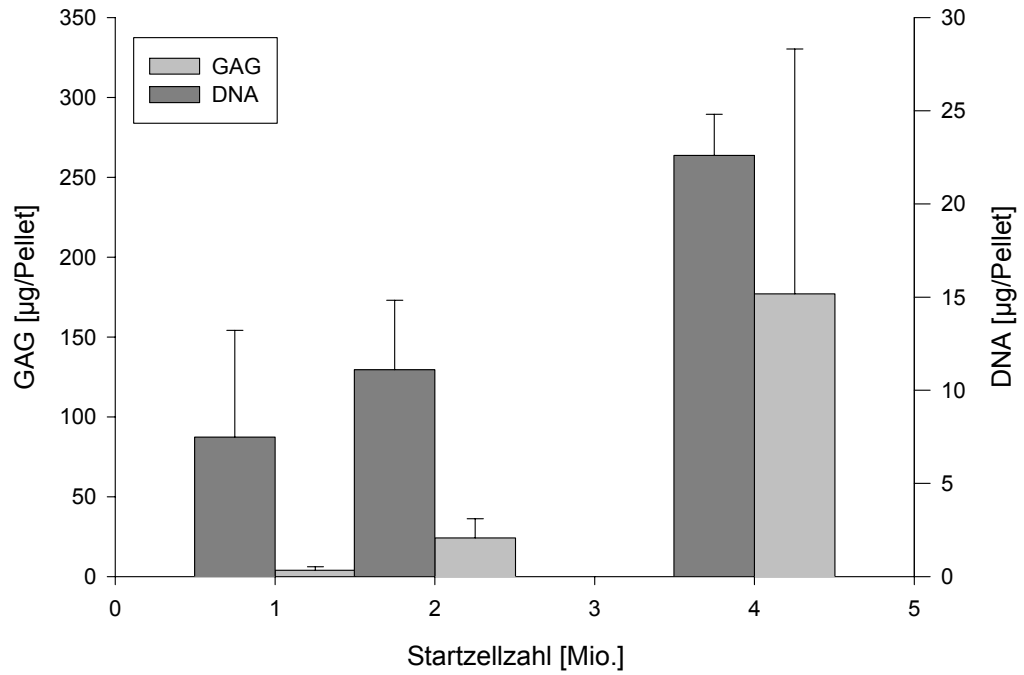


Abb. 3: GAG- und DNA-Messungen in Pellets aus 1, 2 und 4 Mio. Zellen nach 14 Tagen

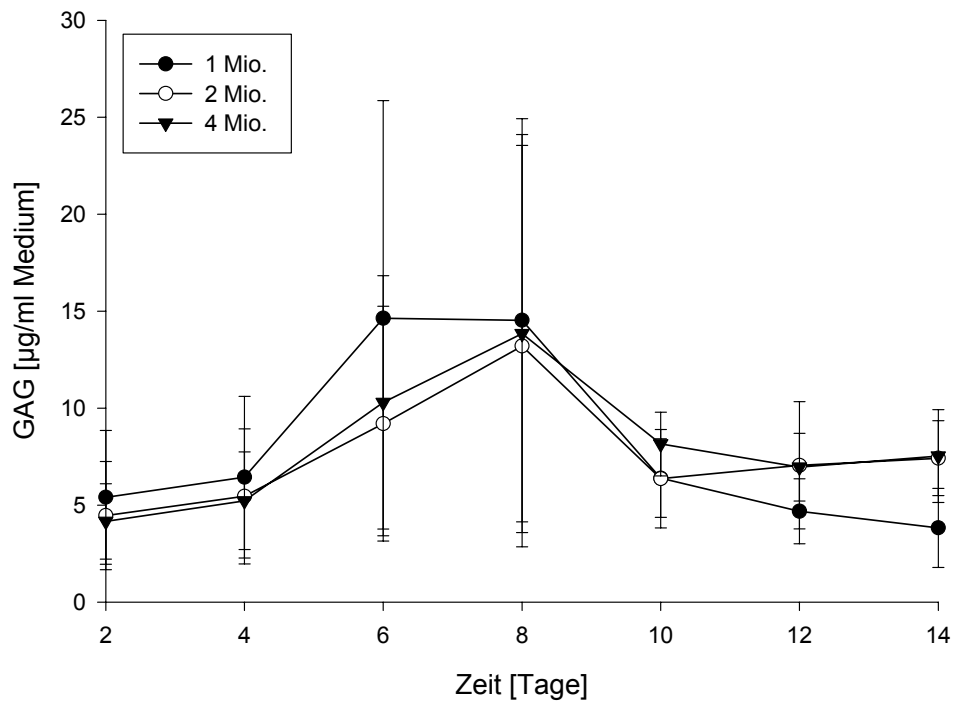


Abb. 4: GAG-Messungen im Medium bei Pellets aus 1, 2 und 4 Mio. Zellen über 14 Tage

Die in den Abbildungen 3 und 4 dargestellten Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass beim Einsatz der höheren Zellzahlen noch keine negativen Einflüsse auf das Überleben der Zellen und die Fähigkeit zur Knorpelbildung als Folge einer drohenden Sauerstoffmangel-Situation zu Beginn des Experiments erkennbar sind. So zeigt sich bei der höchsten Zellzahl sogar eine überproportionale Zunahme der Syntheserate von Glykosaminoglykanen, möglicherweise ein Hinweis auf einen kooperativen Effekt.

Die Analyse der Proben des Kulturmediums alle zwei Tage erwies sich als weniger aufschlussreich. Insbesondere kann aus der ins Medium gelangten Menge von Glykosaminoglykanen offensichtlich nicht einfach auf deren Syntheseraten geschlossen werden. Während es bei den steigenden Zellzahlen auch zu steigenden Syntheseraten von Glykosaminoglykanen gekommen ist, zeigen die Mediumwerte keine signifikanten Unterschiede. Daher muss hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs zunächst offen bleiben, ob die Glykosaminoglykan-Produktion nach 8 Tagen tatsächlich abnahm oder ob sich nur der ins Medium gelangte Anteil als Folge der immer kompakter werdenden Pellets mit der Zeit verminderte.

3.3 Einhaltung optimaler Ascorbinsäurekonzentrationen im Medium als Voraussetzung der *in vitro* Chondrogenese

Die Abhängigkeit der Chondrogenese von einer ausreichenden Versorgung mit Ascorbinsäure ist vielfach belegt (DARR et al., 1993, DOZIN et al., 1992, PACIFICI, 1990). Andererseits ist auch bekannt, dass hohe Ascorbinsäurekonzentrationen im Medium auf der Basis der Fenton-Reaktion Anlass zur Bildung potentiell schädlicher reaktiver Peroxide (H_2O_2) gibt (AMIRKHANIAN & MERRITT, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte es daher nur darum gehen, experimentell sicher zu stellen, dass die für die Chondrogenese als optimal ermittelte Konzentration der Ascorbinsäure von 50 $\mu\text{g/ml}$ im Kulturmedium den Zellen über den gesamten Versuchszeitraum zur Verfügung steht. Denn wie sich durch Messungen der Stabilität der Ascorbinsäure unter den konkreten Versuchsbedingungen über einen Zeitraum von 7 Tagen zeigte, nimmt die Konzentration der Ascorbinsäure mit einer Halbwertszeit von weniger als 5 Tagen relativ schnell ab.

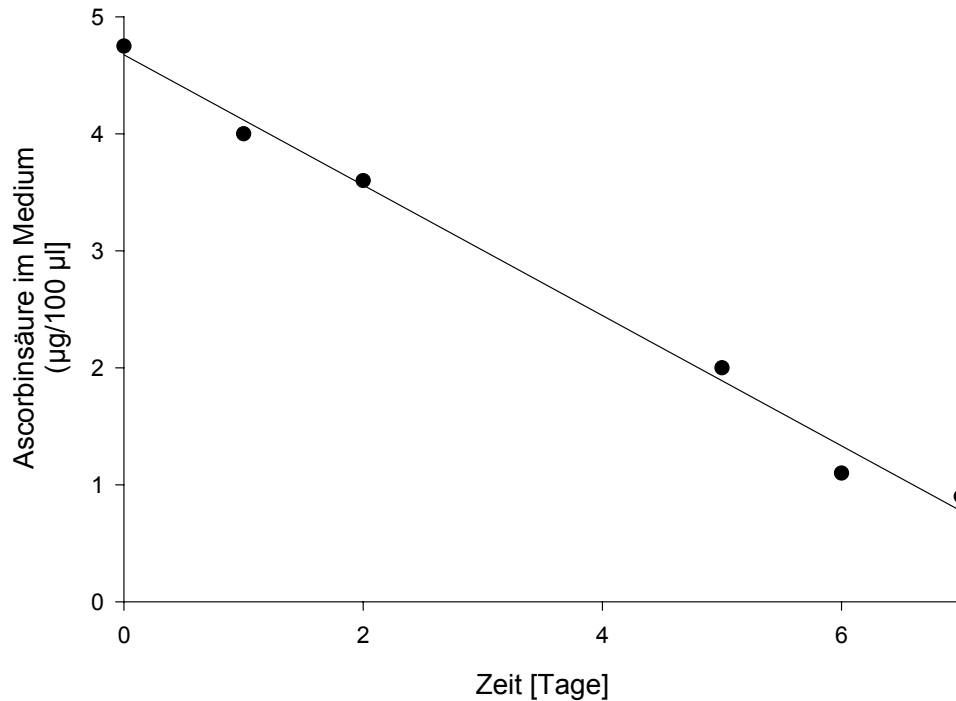


Abb. 5: Ascorbinsäure-Messungen im Medium über 7 Tage

Wie der Darstellung in Abbildung 5 zu entnehmen ist, sinkt die Konzentration der Ascorbinsäure bei zweitägigem Mediumwechsel allerdings nicht unter Werte von 80% der Ausgangskonzentration. Um reproduzierbar annähernd optimale Bedingungen zu schaffen, konnte darauf verzichtet werden, diese Verluste durch kontinuierliche Zugaben im Laufe des Experiments zu kompensieren. Es reichte, die Ascorbinsäure dem Kulturmedium jeweils unmittelbar vor Ansatz des Experiments hinzuzufügen. So zeigte die Überprüfung der Abhängigkeit der Chondrogenese von der Anfangskonzentration der Ascorbinsäure im Medium bei zweitägigem Wechselrhythmus im Konzentrationsbereich zwischen 25 und 50 µg/ml nur geringe – nicht signifikante – Unterschiede.

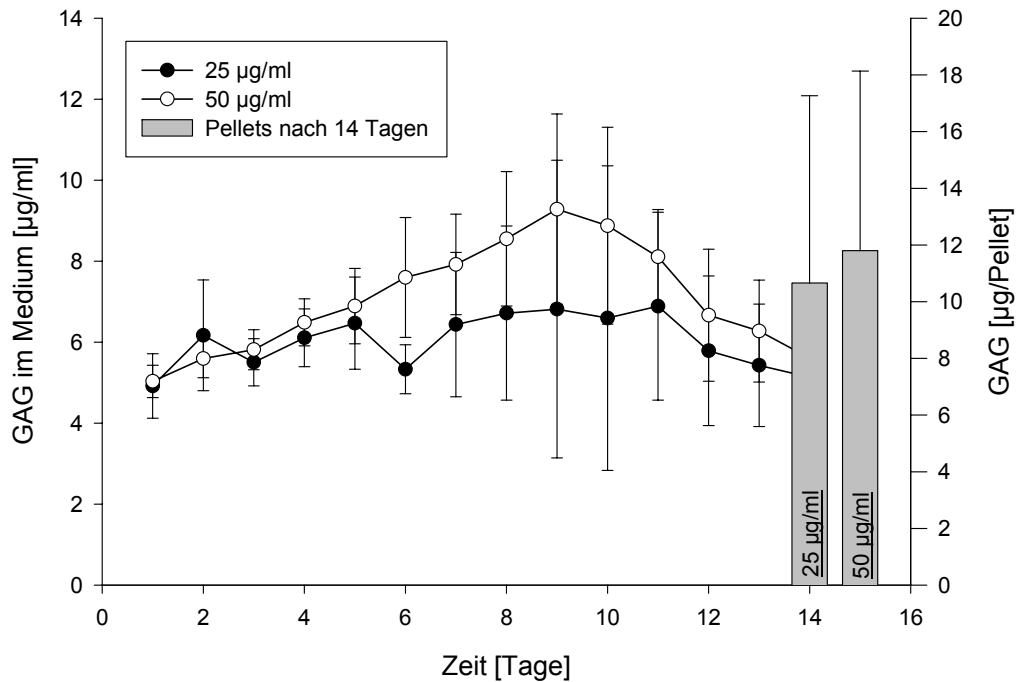


Abb. 6: GAG-Messungen im Medium über 14 Tage bei 25 und 50 µg/ml Ascorbinsäure in Medium sowie im Pellet nach 14 Tagen

Wie der Darstellung der Analyse des GAG-Gehalts der in 14 Tagen produzierten Pellets in Abbildung 6 zu entnehmen ist, liegt die GAG-Bildungsrate bei der Anfangskonzentration von 50 µg Ascorbinsäure pro ml Medium nicht signifikant über der mit der halben Konzentration erreichten Rate. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die Bestimmung der Konzentrationen der an das Medium abgegebenen Mengen von Glykosaminoglykanen bei diesen Ascorbinsäurekonzentrationen. Die Darstellung der Messergebnisse einer Kinetik in Abbildung 6 zeigt nur geringfügig niedrigere GAG-Konzentrationen im Kulturmedium nach jeweils 2 Tagen Kultivierung.

3.4 Zeitlicher Verlauf der Bildungsrate von Knorpel aus *in vitro* vermehrten Zellen

Im Rahmen der Untersuchungen zur Abhängigkeit der Chondrogeneserate von der eingesetzten Startzellzahl und der Ascorbinsäurekonzentration wurden zusätzlich Messungen durchgeführt, um den Grund für den in den Abbildungen 4 und 6 dargestellten Abfall der GAG-Konzentration im Medium festzustellen. Die Ergebnisse bestätigen den Verdacht, dass nach einem monotonen Anstieg innerhalb der ersten

sieben Tage zu Beginn der zweiten Woche ein Abfall der an das Medium abgegebenen GAG-Mengen einsetzt. Grund dafür kann sowohl ein sinkender Verlust an produzierten Knorpelkomponenten als Zeichen der hohen Qualität des bereits gebildeten Gewebes sein, als auch eine unerwünschte Umschaltung von anabolen auf katabolen Stoffwechsel mit der Folge eines generellen Abbaus der Knorpel pellets. Um zu einer Entscheidung zu kommen, welche dieser beiden Möglichkeiten dieses Phänomen eher erklärt, wurde zunächst eine Analyse der in den Pellets (5 und 8 Mio. Zellen/4ml Medium) gebildeten GAG-Mengen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit durchgeführt.

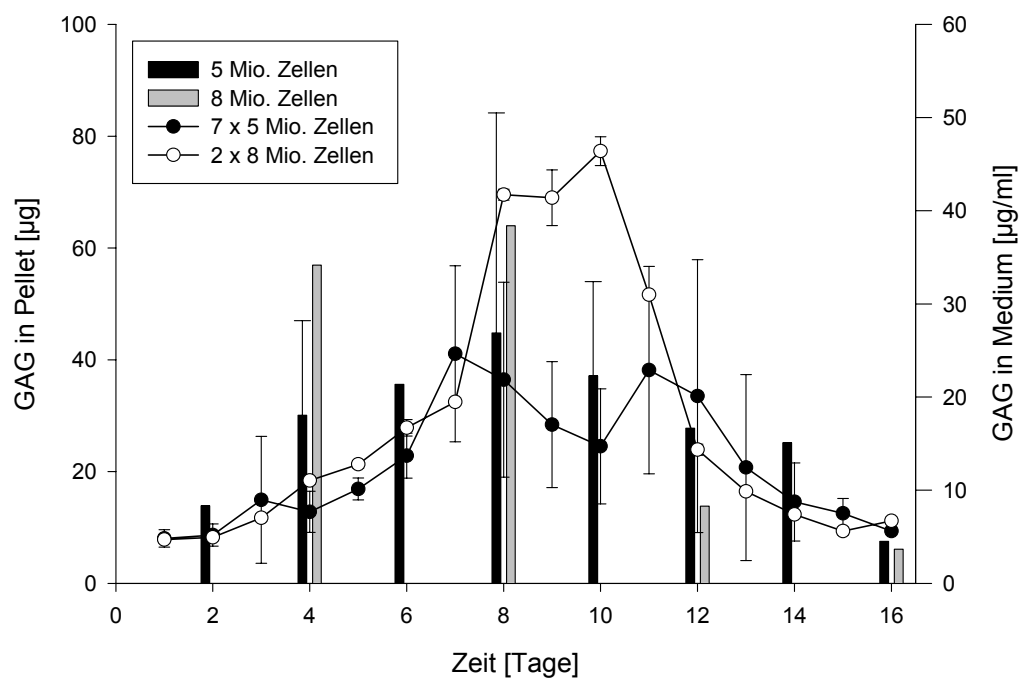


Abb. 7: GAG-Messungen in Medium und in Pellets aus 5 und 8 Mio. Zellen über 16 Tage

Die in der Abbildung 7 zusammengefassten Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, dass die anfänglich gebildeten Knorpel pellets, egal welcher Startzellzahl, unter den konkreten Versuchsbedingungen im Verlauf der zweiten Woche fast vollständig abgebaut wurden. Dieser Schluss wird auch durch den direkten visuellen Eindruck bestätigt (Abb. 8). Nach einer Woche erkennt man große Knorpelstücke, die im Laufe der zweiten Woche regelmäßig ihre Ursprungsgröße und -beschaffenheit wieder verlieren.

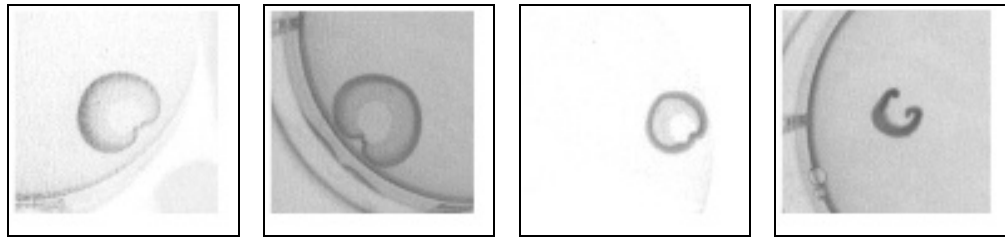


Abb. 8: Makroskopische Darstellung eines Pellets aus 5 Mio. Zellen nach 4, 6, 13 und 16 Tagen

Da es Aufgabe dieser Arbeit war, Rahmenbedingungen für die Herstellung von Implantaten zur Therapie von Gelenkflächenschäden zu erarbeiten, konzentrierten sich die folgenden Experimente zunächst auf die Analyse dieses Phänomens der spontanen Knorpeldegradierung. So wurde zunächst untersucht, ob der beobachtete Knorpelabbau in der zweiten Woche etwa Folge des Einsatzes einer zur Zellaggregation ungeeigneten Technik war.

3.5 Einfluss von Aggregationstechnik und Antioxidantien auf die Knorpelbildung *in vitro*

Hohe räumliche Zelldichten wie sie zur Initiierung der Chondrogenese notwendig sind, bringen scheinbar mit steigender absoluter Zellzahl eine wachsende Gefahr metabolischer Störungen des Chondrozytenstoffwechsels mit sich. Um festzustellen, wie weit Ver- und Entsorgungsengepässe mit für die zeitliche Instabilität der frisch gebildeten Knorpelproben verantwortlich sind, wurde eine schnellere Technik zur Aggregation der Zellen appliziert und ein Verfahren zur Bestimmung der minimalen Aggregationszeit entwickelt.

Zusätzlich wurde neben der üblichen Verwendung von 1 mMol/ml Cystein im Kulturmedium auch der Effekt anderer stärker wirkender Antioxidantien überprüft, um der mit höherer Zelldichte wachsenden Gefahr des oxidativen Stresses wirksamer begegnen zu können. Dazu wurde konkret mit N-Acetyl-Cystein, eine länger wirksame Depotform des Cysteins, mit EDTA ein Chelator für Eisen-Ionen zur Inhibierung der Fenton-Reaktion, sowie mit Katalase die Möglichkeit zum effektiven und schnellen Abbau von schädlichem Wasserstoffperoxid ausgewählt.

Bei der bisher angewandten Technik mussten Chondrozyten wenigstens 30 Minuten bei einer Konzentration von $2 \times 10^6 / 0,2 \text{ ml}$ stehen gelassen werden, um ihnen ausreichend Gelegenheit zur Aggregation zu geben. Erst danach konnte das Volumen des Mediums gefahrlos vergrößert werden, ohne die Zellaggregate wieder zu desaggregieren. Wenn die Aggregationszeit verkürzt werden sollte, konnte dies nur durch Sedimentation der Zellen zu noch dichteren Pellets durch Applikation höherer g-Zahlen als 1 erreicht werden. Um den zeitlichen Verlauf des biologischen Effektes der Aggregation beobachten zu können, wurden Aliquots von je 2×10^6 Zellen kurz zentrifugiert und zu verschiedenen Zeiten einem Aggregationstest unterzogen. Dieser bestand im wesentlichen in dem Versuch, die Zellpellets durch definiertes Pipettieren wieder zu desaggregieren. Die Anzahl Zellen, die sich nicht wieder desaggregieren ließ, wurde als Maß für den Aggregationsfortschritt gewertet.

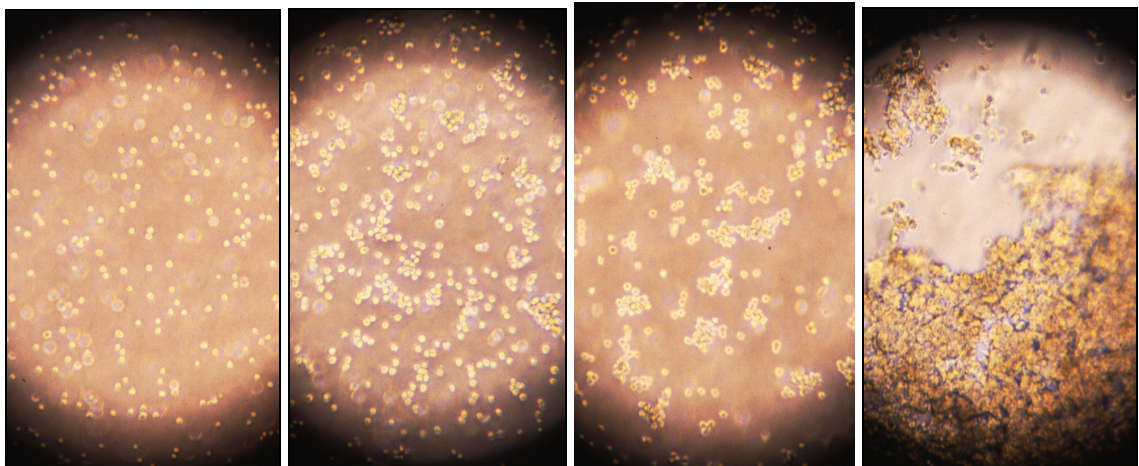


Abb. 9: Mikroskopische Darstellung suspendierter Zellen sofort, sowie 40, 60 und 180 Min. nach Aggregation

In Abbildung 9 sind Fotos der nach verschiedenen Zeiten resuspendierten Zellaggregate zu sehen. Man erkennt deutlich die mit der Zeit zunehmende Aggregationstendenz der Chondrozyten über einen Zeitraum von 3 Stunden.

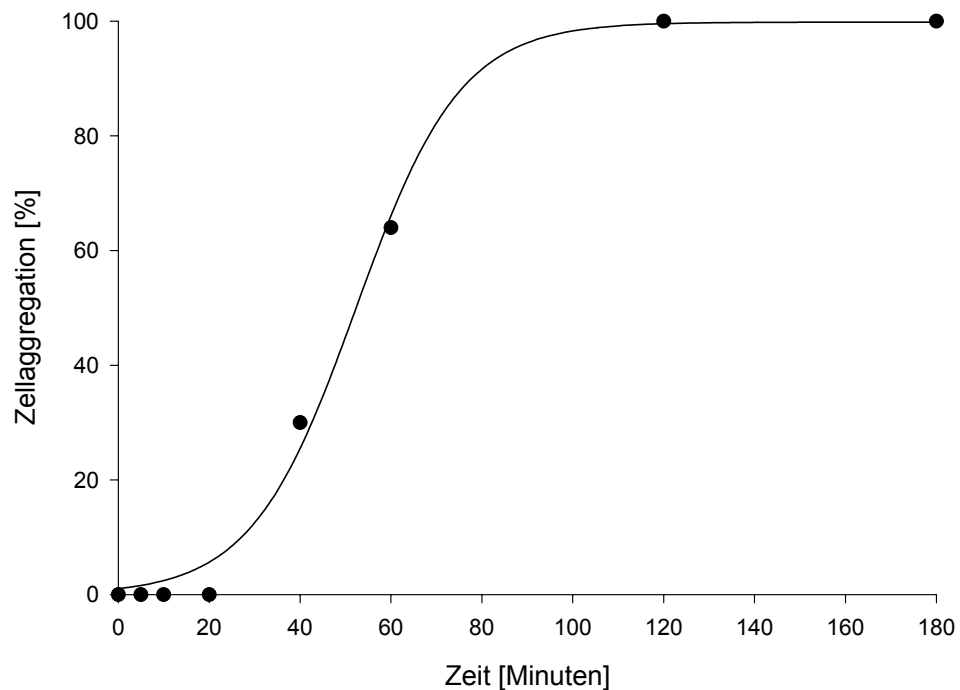


Abb. 10: Darstellung des prozentualen Anteils aggregierter Knorpelzellen nach Resuspension

In Abb. 10 ist der prozentuale Anteil aggregierter Zellen über einen Zeitraum von 180 Minuten dargestellt. Nach 40 Minuten kommt es erstmals zu stabilen Aggregationen, die sich durch Resuspension nicht mehr vollständig aufheben lassen. Nach 60 Minuten sind 50% der Zellen nicht mehr zu desaggregieren. Hier liegt der Wendepunkt eines sigmoiden Kurvenverlaufs, der in einer nahezu hundertprozentigen Aggregation nach 120 Minuten resultiert.

Aus diesen experimentellen Daten lässt sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine mittlere Aggregationszeit von etwa 60 Minuten ableiten. Um die mit der hohen Zelldichte während der Aggregationszeit verbundene Gefahr der Mangelversorgung zu minimieren, ist es allerdings nicht notwendig so lange mit der Substitution von frischem Medium zu warten. Um den optimalen Zeitpunkt experimentell herauszufinden, wurden die Zellpellets nach unterschiedlichen Zeiten vorsichtig mit frischem Kulturmedium überschichtet und für eine Woche kultiviert, bevor der GAG-Gehalt bestimmt wurde.

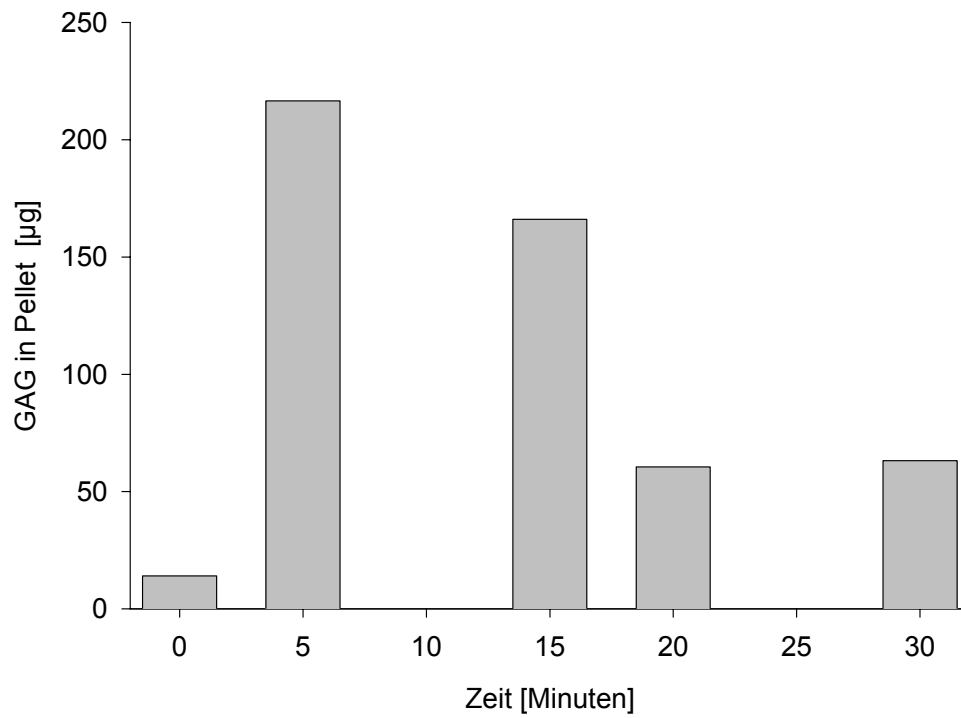


Abb. 11: GAG-Messungen in Pellets sofort, sowie 5, 15, 20 und 30 Minuten nach Mediumüberschichtung

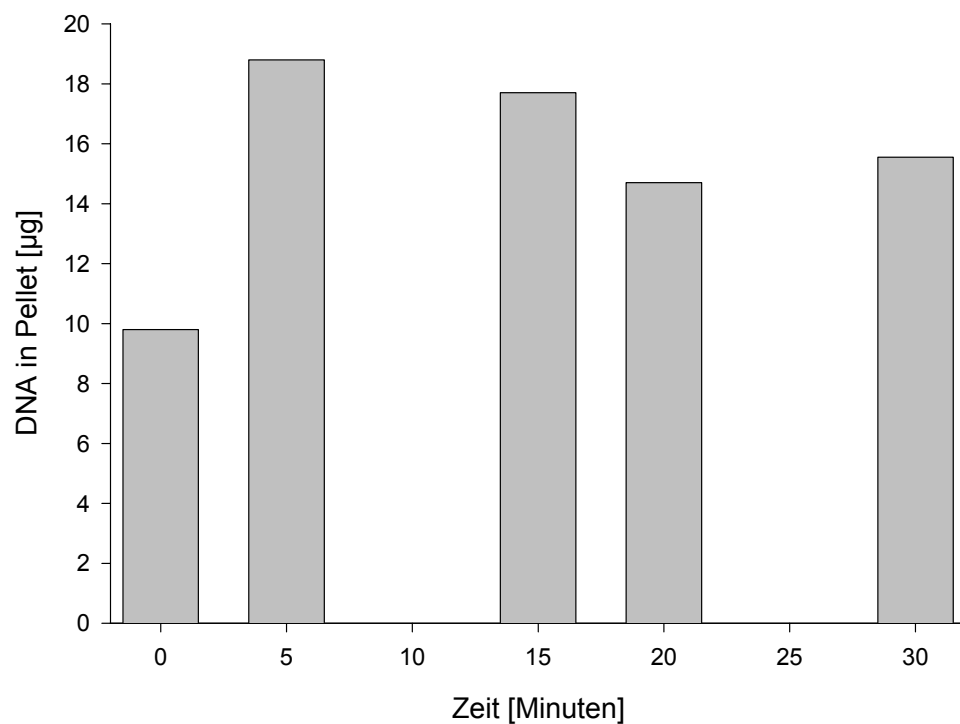


Abb. 12: DNA-Messungen in Pellets sofort, sowie 5, 15, 20 und 30 Minuten nach Mediumüberschichtung

Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Man erkennt, dass die Fähigkeit zur GAG-Synthese tatsächlich stark darunter leidet, wenn die Zellen zu lange auf frisches Medium warten müssen. Bei Anwendung dieser alternativen Aggregationstechnik werden wesentlich bessere Ergebnisse erzielt, wenn bereits zum technisch frühesten Zeitpunkt, das heißt nach 5 Minuten Aggregation Kulturmedium nachgefüllt wird. Das Experiment gibt allerdings keine Auskunft darüber, in wie weit die Zellen auch schon in diesen ersten 5 Minuten nachhaltig geschädigt wurden. Wird noch früher Medium zu den Pellets gegeben, treten signifikante Zellverluste durch Resuspendierung auf, wie durch Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellpellets festgestellt werden konnte (Abbildung 12).

Um den Einfluss der effektiveren Aggregationstechnik auf die Stabilität der *in vitro* gebildeten Knorpelproben zu überprüfen, wurde eine Serie von Pelletkulturen mit je 5×10^6 Zellen angesetzt, bei denen die erste Substitution mit frischem Medium jeweils 5 Minuten nach der physikalischen Aggregation erfolgte. Zusätzlich wurde die Wirkung von 1 mMol/l Cystein und 30 mMol/l NAC neben 50 µg/ml Ascorbinsäure als Antioxidantien im Kulturmedium untersucht.

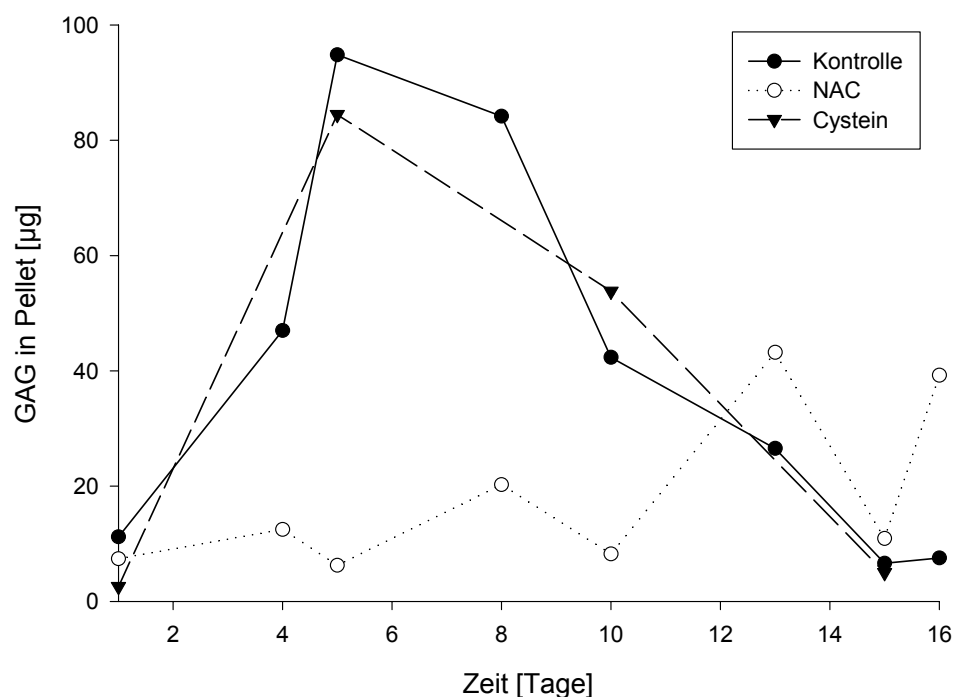


Abb. 13: GAG-Messungen in Pellets an unterschiedlichen Tagen über einen Zeitraum von 16 Tagen

Die Analyse des GAG-Gehalts des gebildeten Knorpels erfolgte an separaten Proben, die nach verschiedenen Zeiten im Laufe von zwei Wochen aufgearbeitet wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Man erkennt, dass die maximale GAG-Produktion mit und ohne Cystein-Zusatz schon nach 5 Tagen erreicht wird und nach 8 Tagen deutlich abfällt. Werden Antioxidantien in noch höherer Konzentration angeboten (30 mMol/l NAC), wird zwar kein Knorpelabbau mehr beobachtet, dies aber nur deshalb, weil es im gewählten Zeitraum erst gar nicht zu einer vergleichbaren Syntheserate von Glykosaminoglykanen kommt.

Daraus können folgende Schlüsse gezogen werden; weder ein unzureichender Schutz vor oxidativem Stress, noch der Mangel an Nährmedium in der Anfangsphase allein können für die offensichtliche Umschaltung des Chondrozytenstoffwechsels von Aufbau auf Abbau nach etwa einer Woche Kultur erklären. Der in Abbildung 11 dargestellten vergleichenden Analyse der Wartezeiten nach Aggregation ist zu entnehmen, dass die neu entwickelte Aggregationstechnik zwar eine Vervierfachung der Netto-Syntheserate der Glykosaminoglykane erlaubt, wenn man die Wartezeit von ursprünglich 30 Minuten auf 5 Minuten verkürzt, jedoch scheint sich dies nicht auf die metabolische Stabilität der Knorpelproben auszuwirken. Hinsichtlich der Wirkung der Antioxidantien ist zu sagen, dass die Wegnahme des routinemäßig verwendeten Cysteins („Kontrolle“ in Abbildung 13) ohne sichtbare Wirkung bleibt. Dagegen hat die Intensivierung des reduzierenden Milieus katastrophale Folgen; die Knorpelbildung schein erst gar nicht in Gang zu kommen.

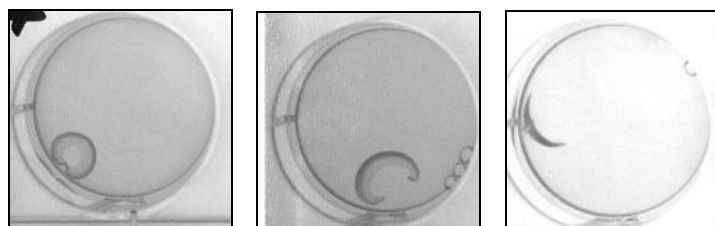


Abb. 14: Makroskopische Darstellung von Pellets nach 6 Tagen, behandelt mit Ascorbinsäure, Cystein und NAC (von links nach rechts)

Dieser Schluss wird auch durch die direkte visuelle Kontrolle während der 14-tägigen Kultivierung bestätigt. Während mit und ohne Zusatz von Cystein sich nach 1 Woche mehrere mm große kompakte Gewebe gebildet hatten, konnte dies in Gegenwart von NAC nicht beobachtet werden (Abb. 14).

3.6 Katalase verhindert die für die Initiierung der Knorpelbildung notwendige Aggregation der Chondrozyten – EDTA verursacht Schäden bei der Gewebebildung

Es liegt zwar nahe, die negative Wirkung des NAC auf die Knorpelbildung auf dessen Eigenschaft zurückzuführen, durch Freisetzung von Cystein ein stärker reduzierend wirkendes Kulturmilieu zu schaffen, doch sollte diese Vermutung durch ein weiteres Experiment bestätigt werden, weil sich daraus weitreichende Auswirkungen für die Zusammensetzung eines für die Knorpelkultivierung optimierten Mediums ergeben.

Um möglichst wenig Raum für mehrdeutige Interpretationsmöglichkeiten der experimentellen Messungen zu lassen, wurde entschieden, die mögliche Rolle von Wasserstoffperoxid im Kulturmedium durch Zugabe von Katalase zu testen, ein Enzym, das H_2O_2 durch Disproportionierung zu Sauerstoff und Wasser beseitigt. Um auch deutlich sichtbare Ergebnisse zu erzielen, wurde eine Reihe von Zellpellets von je 5×10^6 Zellen 5 Minuten nach physikalischer Aggregation auf ein Gesamtvolumen von je 4 ml Medium gebracht und für zwei Wochen bei täglichem Mediumwechsel kultiviert. Das Kulturmedium enthielt entweder keine Zusätze (Kontrolle), 500 Units Katalase /ml oder 25 $\mu\text{Mol/l}$ EDTA. Letzteres wurde zusätzlich in die Untersuchung einbezogen, weil es die Peroxid liefernde Fenton-Reaktion durch Komplexierung des Eisen-Ions hemmen sollte.

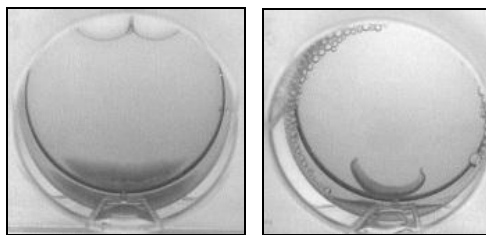


Abb. 15: Makroskopische Darstellung von Pellets nach 2 Tagen, behandelt mit Katalase und EDTA (von links nach rechts)

Das Ergebnis zeichnete sich schon nach wenigen Tagen ab (Abb. 15); in Gegenwart von Katalase kam es zu keiner sichtbaren Gewebebildung. Die Zellen blieben während der ganzen Zeit locker suspendiert. Die enzymatische Erniedrigung der basalen H_2O_2 -Konzentration schien die Knorpelbildung damit bereits in der Initialphase der Aggregation zu verhindern. Die Wirkung der eingesetzten EDTA-Konzentration ging

offensichtlich in dieselbe Richtung, wenn auch quantitativ nicht so weit. Es bildeten sich ähnlich kleine und kaum elastische Proben wie in Gegenwart der Behandlung mit NAC. Dieser visuelle Eindruck wurde nach Messung der GAG-Gehalte der Proben nach 14-tägiger Kultivierung voll bestätigt. In Gegenwart von 500 Units/ml Katalase bildete sich kaum noch ein Viertel der Glykosaminoglykane wie in der Kontrolle, bei Behandlung mit EDTA sank der GAG-Gehalt etwa auf die Hälfte der Kontrolle.

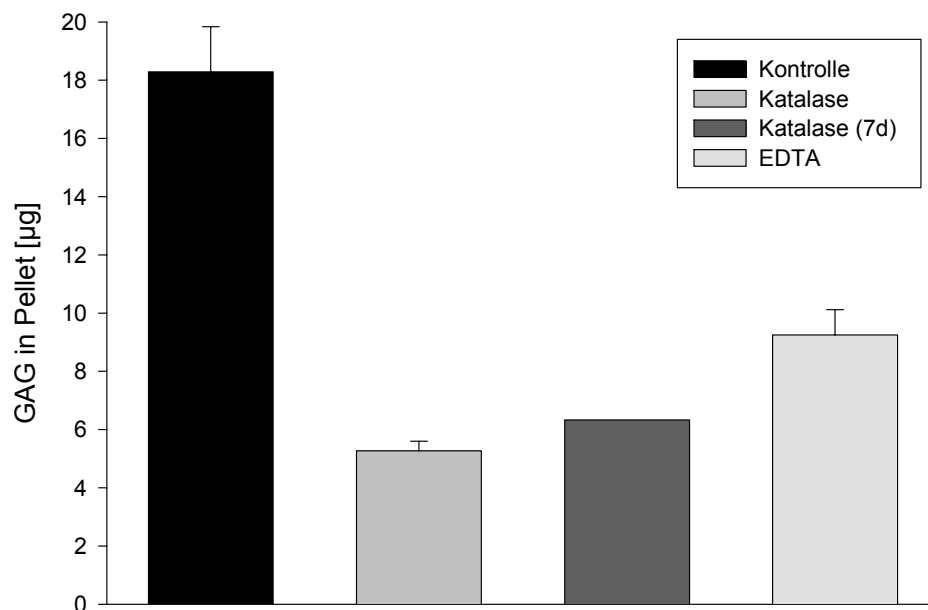


Abb. 16: GAG-Messungen in Pellets nach 14-tägiger Behandlung mit Katalase und EDTA

Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass oxidativer Stress kaum für die frühzeitige Degradierung des in der ersten Woche gebildeten Knorpels verantwortlich ist. Eher muss angenommen werden, dass eine minimale Konzentration an Wasserstoffperoxid im Kulturmedium Voraussetzung für die Knorpelbildung ist. Dabei scheint die unterstützende Wirkung des Wasserstoffperoxids nicht auf die Anfangsphase (Aggregation) beschränkt zu sein. So behinderte ein Zusatz von Katalase zum Kulturmedium die Knorpelbildung auch, wenn er erst nach 7 Tagen Kultivierung erfolgte. In diesem Fall lagen die Endkonzentrationen an GAG im verbliebenen Zellagglomerat ebenso niedrig wie in Ansätzen mit durchgehender Katalase-Behandlung (Abb. 16).

Die die Knorpelbildung hemmende Wirkung der eingesetzten EDTA-Konzentration muss nicht notwendigerweise auf der Hemmung der Fenton-Reaktion beruhen. Entscheidend ist in diesem Kontext, dass der EDTA-Effekt der These nicht widerspricht, dass eine minimale Peroxidkonzentration unter den gegebenen experimentellen Bedingung nicht schädlich sondern essentiell für die Knorpelbildung zu sein scheint.

3.7 Histologische Untersuchungen der gebildeten Knorpelproben weisen auf Apoptosen als Mechanismus des Gewebeabbaus hin.

Histologische Schnitte von Knorpelproben wurden nach 7 Tagen Kultur mit HE angefärbt.

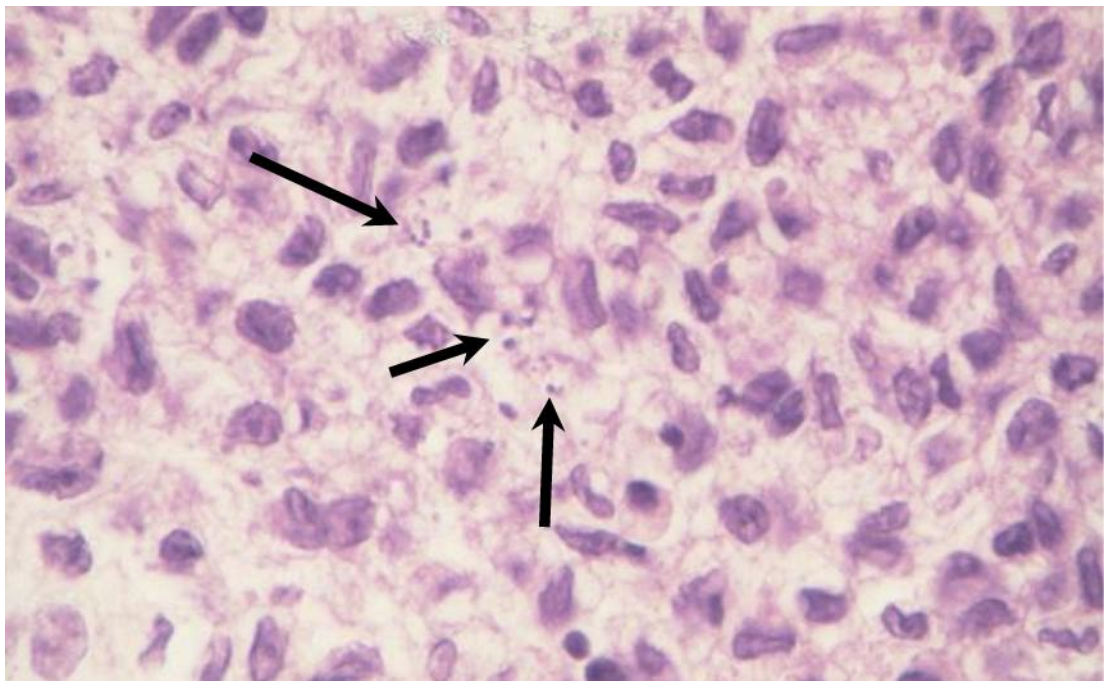


Abb. 17: Mikroskopische Darstellung apoptotischer Zellen (Pfeile) nach histologischer Aufarbeitung eines 7 Tage alten Pellets mit Hämalaun-Eosin; bei einer hohen Zelldichte findet sich wenig interzelluläre Matrix.

Die mikroskopische Untersuchung weist zunächst auf die beginnende Bildung eines knorpelähnlichen Gewebes hin. Besonders in den Randzonen kann man erkennen, dass die Zellen bereits Matrix im Interzellularraum deponiert haben. Weiter in der Mitte der Präparate fanden sich jedoch in allen untersuchten Proben Löcher; hier fehlte offensichtlich bereits Gewebe. Rings um diese Löcher fanden sich nun mit relativ

großer Häufigkeit die typischen morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen; die gut angefärbten Zellkerne waren oft entweder pyknotisch, in zahlreiche Teile zerlegt oder schon ganz aufgelöst (BURSCH et al., 1990). Dagegen findet man keine Anzeichen von Nekrosen, die sowohl bei einer unzureichenden Ver- und Entsorgungslage als auch bei zytotoxisch wirkendem Stress als Ursache für den Knorpelabbau zu erwarten gewesen wäre. Interpretiert man diese Bilder als Momentaufnahme, lässt sich daraus der Hinweis ableiten, dass der beobachtete Knorpelabbau weniger durch mangelnde Versorgung mit Nährstoffen verursacht wird, sondern als Folge des Ausbleibens notwendiger chondrogener Signale zu verstehen ist.

3.8 Hinweise auf Stickstoffmonoxid (NO) als Mediator des Knorpelabbaus in Gewebekulturen

Um weitere experimentelle Daten zu erheben, die die Vorstellung unterstützen, dass der in der Gewebekultur beobachtete spontane Knorpelabbau eine Folge des Mangels an chondrogenen Signalen ist, wurde von folgender Überlegung ausgegangen: Gesunder Knorpel ist *in vivo* Produkt eines ausgewogenen dynamischen Gleichgewichts zwischen anabolen und katabolen Prozessen. Als wichtiger Auslöser einer überwiegenden Degradierung von Knorpelgewebe ist seit langem eine erhöhte Konzentration von Interleukin 1 (IL-1) in der Synovialflüssigkeit bekannt. Wenn die Wirkung dieses unter anderem auch an Entzündungsreaktionen beim Chondrozyten beteiligten Zytokins die anabol wirkender Gegenspieler – im wesentlichen Mitglieder der Familie der Transformierenden Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- β 1 – überspielt, resultiert ein Nettoabbau von Knorpelgewebe, wobei die Chondrozyten nach und nach über den Mechanismus der Apoptose eliminiert werden. Diese Befunde erklären die experimentellen Beobachtungen der spontanen Knorpeldegradierung nach einer Woche Gewebekultur allein noch nicht, da sie ja ohne Zusatz von Interleukin 1 eintraten und auch nicht bekannt ist, dass dieses Zytokin von Chondrozyten ausgeschüttet wird. Die entscheidende Idee für das experimentelle Konzept stützt sich auf Berichte, wonach der von IL-1 ausgelöste programmierte Zelltod bei Chondrozyten-Kulturen durch Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird (ABRAMSON et al., 2001, HÄUSELMANN et al., 1998, LOTZ et al., 1999, STUDER et al., 1999). So wurden die im folgenden beschriebenen Experimente mit dem Ziel konzipiert, festzustellen, ob Chondrozyten- und/oder der daraus gebildete Knorpel *in vitro* unter den beschriebenen

Kulturbedingungen zeitlich vor dem beobachteten Abbau signifikante Mengen von NO produzieren, so dass ein kausaler Zusammenhang denkbar ist.

In der ersten Serie von Experimenten ging es zunächst darum, zu verifizieren, dass eine im verwendeten Kulturmedium künstlich erhöhte NO-Konzentration unter den konkreten Bedingungen tatsächlich zum beschleunigten Knorpelabbau und apoptotischen Zelltod führt. Als NO-Quelle wird das für die geplante Anwendung bereits von den oben genannten Autoren erfolgreich eingesetzte Nitroprussidnatrium (SNP) bei einer Konzentration von 1 mMol/l verwendet. Es liefert durch spontane Hydrolyse unter den Bedingungen des Kulturmediums eine über mehrere Tage hinweg exponentiell abfallende Konzentration von freiem NO, das schnell mit Wasser zu Nitrit reagiert. Die Summe des jeweils im Laufe von 2 Tagen gebildeten NO kann durch Bestimmung des Nitritgehalts im Medium nach jedem Mediumwechsel erfasst werden. Die wahren physiologisch wirksamen NO-Konzentrationen liegen viel niedriger und bleiben bei diesen Messungen unbekannt. Für einen Vergleich der Wirkungen unterschiedlich hoher NO-Konzentrationen können die gemessenen Nitritkonzentrationen im Zweitage-Medium herangezogen werden, da für die Bildung von Nitrit aus NO unter konstanten Bedingungen eine konstante Bildungsrate angenommen werden kann. Dies ist für den Zerfall des SNP zu NO nicht unbedingt der Fall wie das erste Experiment zeigt.

Eine Serie von Ansätzen mit Pellets aus je 4×10^6 Zellen pro 4 ml Medium wurde für zwei Wochen kultiviert. Zwei Ansätze erhielten alle 2 Tage frisches Medium mit je 1 mMol/l SNP, 2 Kontrollen Medium ohne zusätzliche NO-Quelle.

Die Kontrollen entwickelten sich wie erwartet. Der GAG-Gehalt stieg bis zum 12. Tag an, um nach rund 3 Wochen wieder auf etwa ein Drittel des Maximalwertes abzufallen. Dagegen zeigte der DNA-Gehalt der Kontrollen nur einen leichten Abfall. Das Bild ändert sich jedoch vollständig, wenn die Ergebnisse mit SNP-Behandlung betrachtet werden. Bei visueller Beurteilung ist gar keine Bildung von Knorpelgewebe mehr zu erkennen. Auch die GAG-Gehalte liegen an der Nachweisgrenze, so dass nach 12 Tagen keine weiteren Messungen mehr durchgeführt wurden. Zu diesem Zeitpunkt war auch

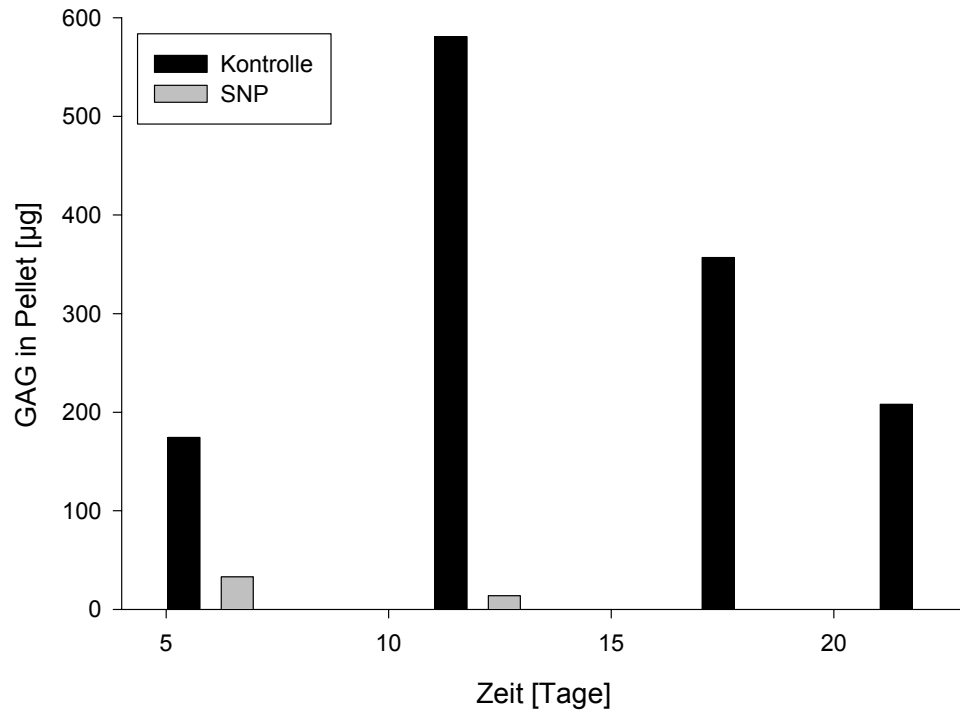


Abb. 18: GAG-Messungen in Pellets (SNP-Zusatz zu Beginn der Kultur) über 22 Tage

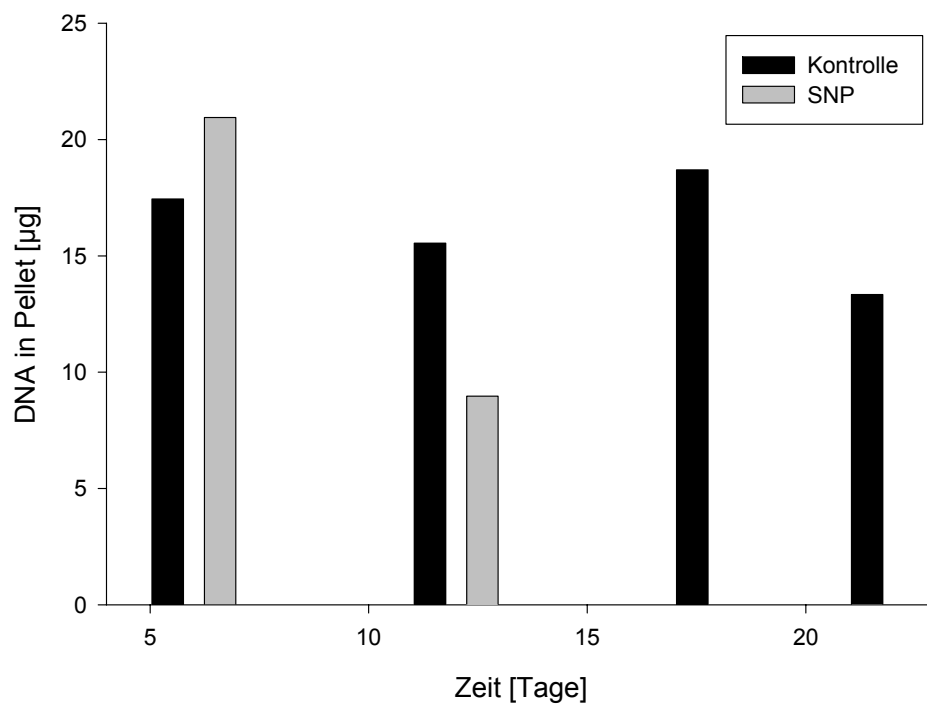


Abb. 19: DNA-Messungen in Pellets (SNP-Zusatz zu Beginn der Kultur) über 22 Tage

schon rund die Hälfte der zellulären DNA abgebaut. Damit ist zwar die vermutlich durch das NO hervorgerufene Wirkung in der erwarteten Richtung experimentell

bestätigt worden, doch ließ sich bei diesem Ausmaß der Hemmwirkung nicht mehr beurteilen, ob die Zellen einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod erlitten.

Daher wurde die Serie noch einmal mit leichten Modifikationen im Protokoll wiederholt: Die Behandlung mit der NO-Quelle SNP wurde erst nach 7 Tagen Chondrogenese begonnen und die Messungen des GAG- und DNA-Gehalts erfolgte schon nach 14 Tagen. In allen Fällen erfolgte die Initiierung der Knorpelbildung durch Zentrifugation der Zellen und Auffüllen mit frischem Mediums 5 Minuten nach der Aggregation.

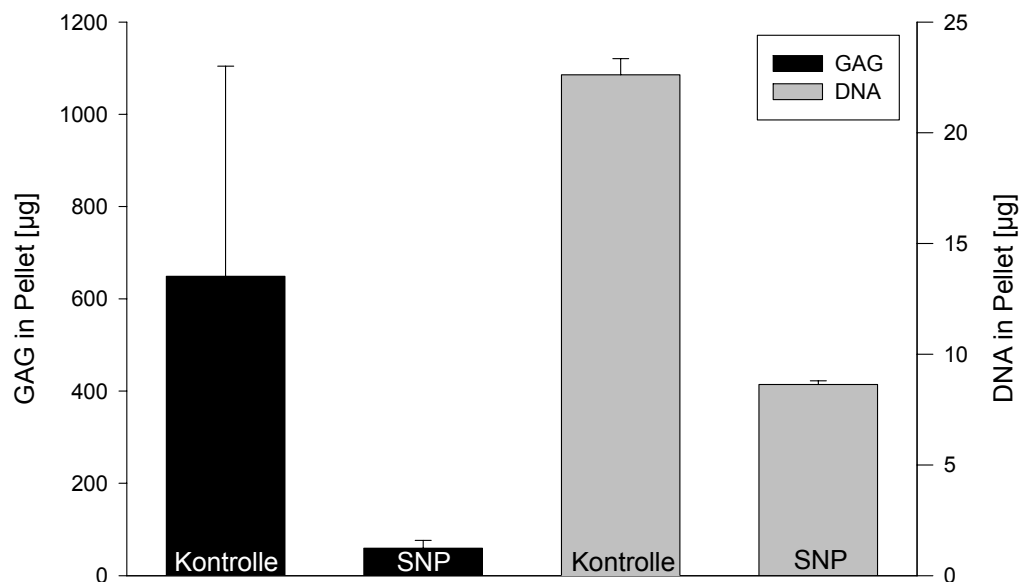


Abb. 20: GAG- und DNA-Messungen in Pellets (SNP-Zusatz nach 7 Tagen) nach 14 Tagen

Die Analyse der GAG- und DNA-Gehalte nach 14 Tagen Kultur lieferte ähnlich signifikante Unterschiede; auch wenn die Generierung des NO erst begann, nachdem sich bereits Knorpel gebildet hatte, sank der GAG-Gehalt etwa auf ein Zehntel des Wertes der Kontrolle, der DNA-Gehalt etwa auf ein Drittel (Abbildung 20). Unterstützt wird dieser Befund auch durch die visuelle Beobachtung: Während die Knorpelproben ohne zusätzliche NO-Quelle nach 14 Tagen noch mehrere mm groß waren, war nach 7 Tagen SNP-Behandlung zwar noch ein Pellet zu erkennen (Abbildung 22), dieses hatte jedoch keinerlei knorpelige Morphologie und eignete sich gerade noch zur Herstellung der gewünschten histologischen Schnitte. Das Ergebnis der HE-Anfärbung ist in

Abbildung 23 gezeigt. Man erkennt auch in diesem Präparat deutlich die typischen Anzeichen apoptotischer Zellkerne.

In Abbildung 21 sind zusätzlich die Ergebnisse der Nitrit-Bestimmungen der Kulturmedien dargestellt, weil sich dabei eine Besonderheit zeigte, mit der nicht gerechnet werden konnte. Bei Einstellung der Konzentration der NO-Quelle auf 1 mMol/l erreicht die Nitritkonzentration ohne Zellen nach zwei Tagen Werte um etwa 80 nMol/ml. Wie die Messwerte zeigen, steigt die Nitritkonzentration in Gegenwart von Chondrozyten bzw. von Knorpel jedoch in fünf Tagen auf etwa doppelt so hohe Werte an. Möglicherweise stimulieren zelluläre Enzyme die NO-Bildung aus SNP. In jedem Fall liegen die Nitrit- und damit auch die NO-Konzentrationen ganz erheblich über den Werten von Kontrollen (3 – 7 nMol/ml), die zwar Knorpel aber kein SNP enthielten.

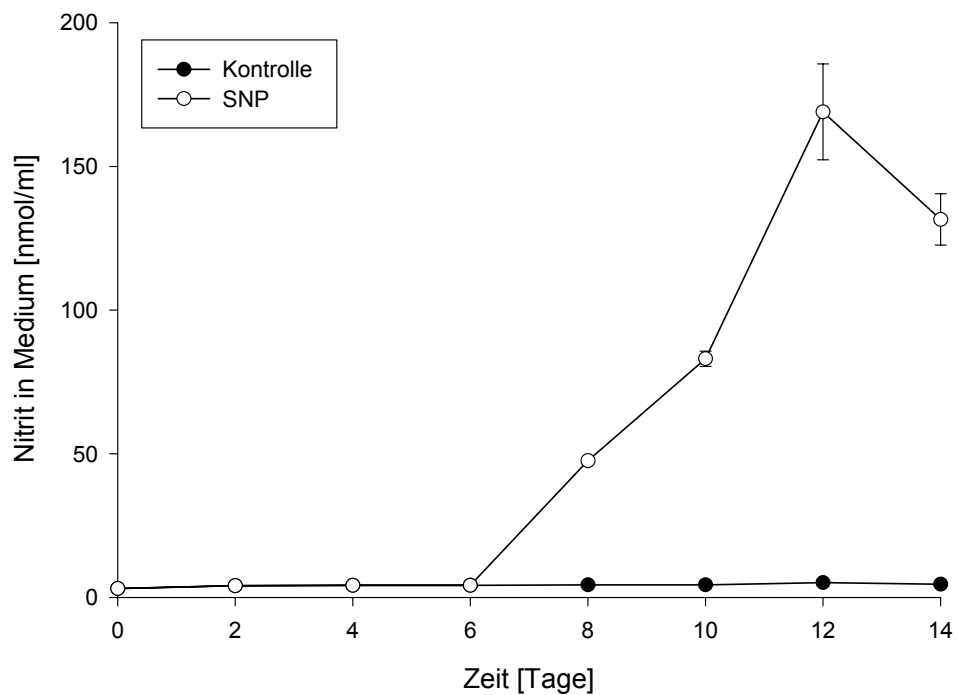


Abb. 21: Nitrit-Messungen im Medium (SNP-Zusatz nach 7 Tagen) über 14 Tage

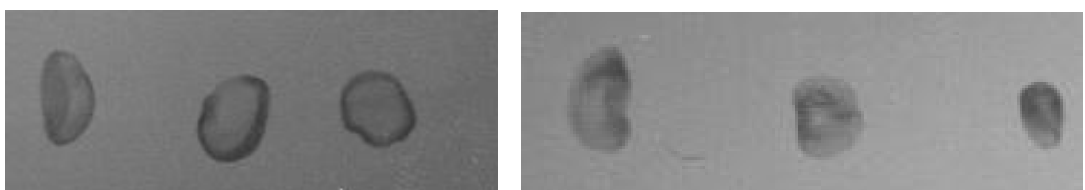


Abb. 22: Makroskopische Darstellung von Kontrollen und der nach 7 Tagen mit SNP behandelten Pellets nach 14 Tagen

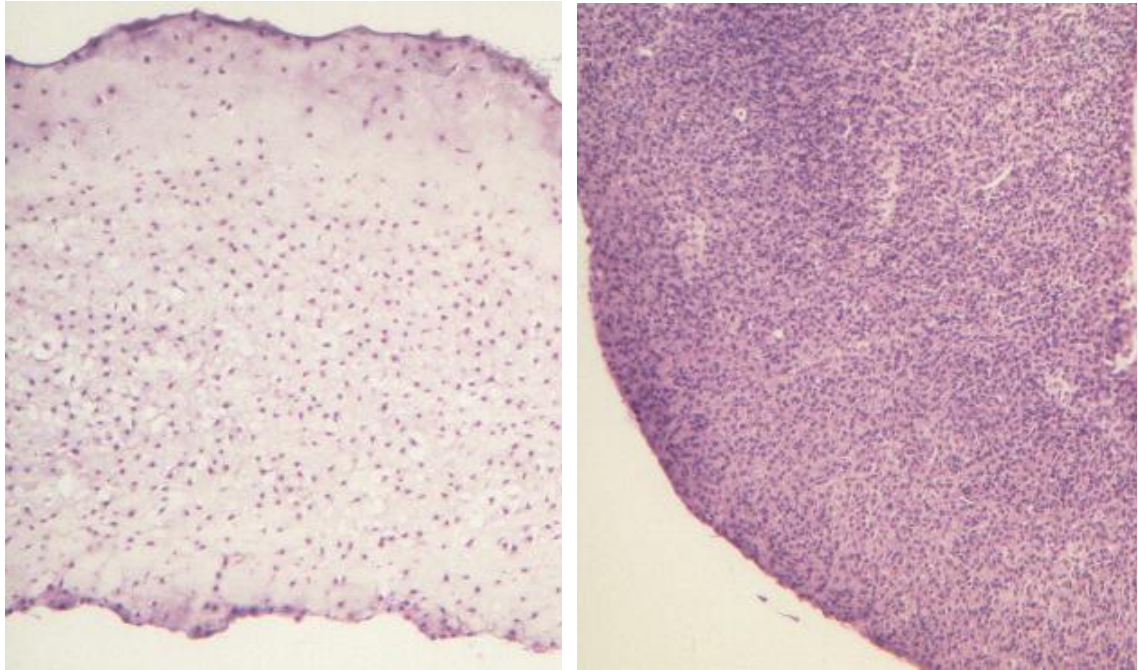


Abb. 23: Mikroskopische Darstellung nach histologischer Aufarbeitung zweier Pellets (links: Kontrolle/ rechts: SNP) mit Hämalaun-Eosin; bei der Kontrolle erkennt man die typischen Strukturen hyalinen Knorpels mit Chondronen und sie umgebenden großen Mengen extrazellulärer Matrix, rechts erkennt man nahezu keine Matrix und eng beieinander liegende Zellen, die sich bei stärkerer Vergrößerung vielfach als apoptotisch identifizieren ließen.

Damit sind die theoretischen und praktischen Voraussetzungen für den Versuch erfüllt, einen experimentell basierten Zusammenhang zwischen NO- und GAG-Produktion in aggregierten Chondrozyten nachzuweisen. Alle bisher analysierten *in vitro* hergestellten Knorpelproben zeigten zwar erhebliche Schwankungen hinsichtlich der produzierten Menge von Glykosaminoglykanen, wiesen aber alle das gemeinsame Phänomen auf, dass einem initialen Anstieg der GAG-Produktion immer ein Abfall mit unterschiedlich ausgeprägter Apoptose-Phase folgte. Diese breite Streuung sollte genutzt werden, eine Korrelation zwischen NO- und GAG-Produktion aufzustellen. Daher wurde eine Serie von 21 Kulturen mit unterschiedlichen Ansätzen angelegt, um von vornherein möglichst unterschiedlich günstige Bedingungen für die metabolische Stabilität des Knorpels zu schaffen. Die Ansätze unterschieden sich sowohl in der eingesetzten Zellzahl (zwischen zwei und vier Millionen) als auch im Zeitpunkt der Auffüllung mit frischem Medium im Anschluss an die physikalische Aggregation (Auffüllung nach fünf und zehn Minuten), die sich bisher als kritisch für die Knorpelstabilität erwiesen hatte. Bei allen 21 Kulturen

wurde 14 Tage lang alle zwei Tage Medium gewechselt und im „verbrauchten“ Medium Nitrit bestimmt. Von allen 21 Kulturen wurde der GAG-Gehalt der nach 14 Tagen noch vorhandenen Pellets bestimmt.

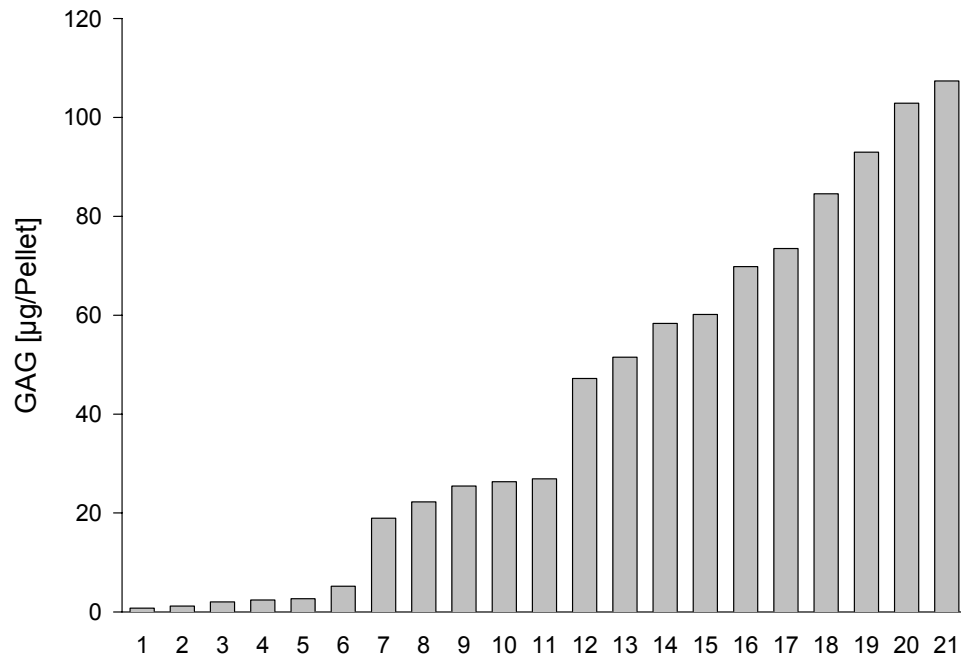


Abb. 24: GAG-Bestimmungen in Pellets nach 14 Tagen in Kultur

Die Ergebnisse der GAG-Bestimmungen sind in der Abbildung 24 zusammengefasst. Wie man erkennt, zeigen sich tatsächlich äußerst unterschiedliche quantitative Ergebnisse. Die Werte reichen von minimal 0,77 µg Chondroitinsulfat bis maximal 107,35 µg Chondroitinsulfat/Pellet. Allerdings konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der GAG-Produktion und der angewandten Technik erkannt werden. Offensichtlich reichte die Datenmenge dafür nicht aus. Daher wurde auf eine entsprechende Zuordnung verzichtet und alle Daten nach absolutem Messwert geordnet und nummeriert dargestellt.

Bei der graphischen Darstellung der Nitrit-Werte im Medium wurden die fünf Pellets mit den niedrigsten GAG-Werten den übrigen sechzehn Pellets gegenüber gestellt. In Abbildung 25 sind die Proben dementsprechend in zwei Diagrammen wiedergegeben, Abbildung 25a enthält die Nitrit-Werte der Pellets 1 bis 5, Abbildung 25b die Werte der übrigen Pellets 6 bis 21.

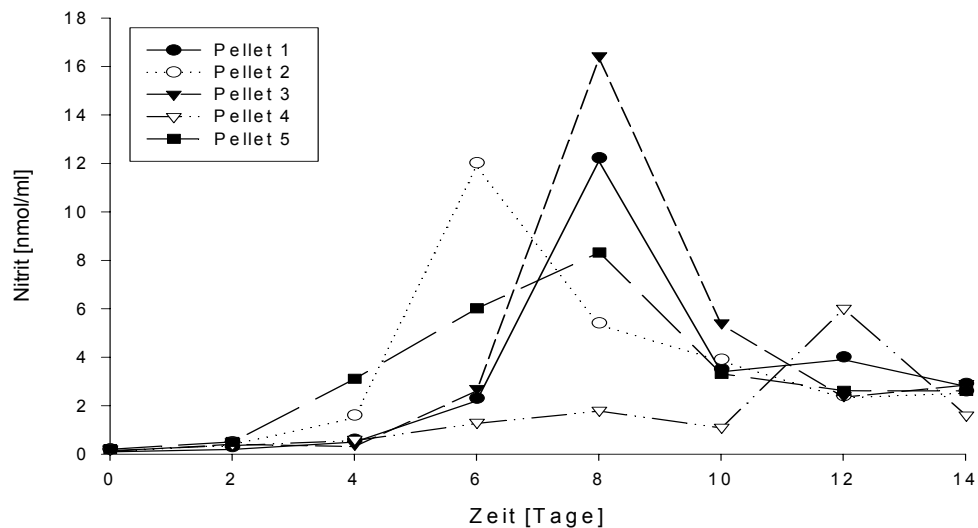


Abb. 25a: Nitrit-Bestimmung im Medium der Pellets 1 bis 5 über 14 Tage

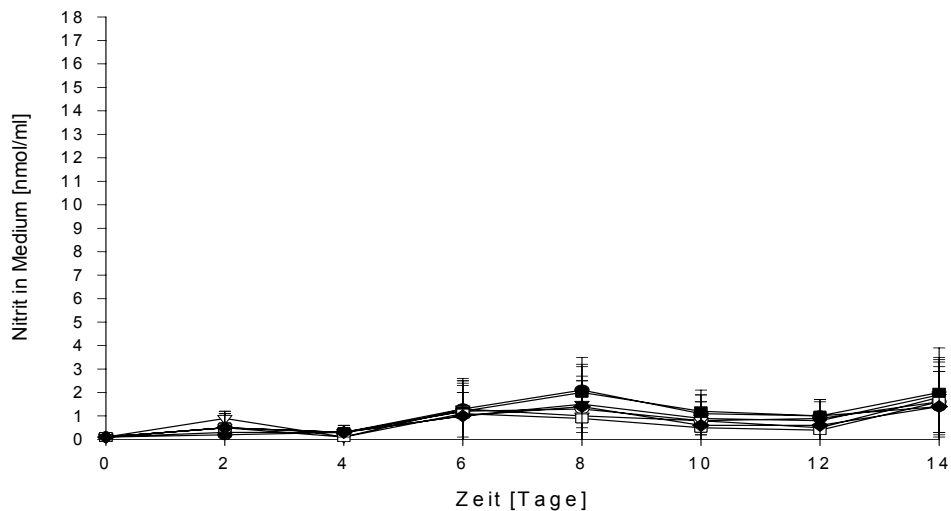


Abb. 25b: Nitrit-Bestimmung im Medium der Pellets 6 bis 21 über 14 Tage

In Abbildung 25a zeigen sich im Medium aller fünf Pellets Nitrit-Werte von über 5 nMol/ml zwischen dem 6. und dem 12. Tag. Dieser Wert wird im Medium der übrigen sechzehn Pellets (Abb. 25b) zu keinem Zeitpunkt während der 14tägigen Beobachtung überschritten. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die im Diagramm dargestellten niedrigsten Messwerte bereits hinsichtlich des Leerwertes von 3,1 nMol/ml korrigiert und signifikant über dem Rauschen liegen.

Es zeigt sich also deutlich, dass die fünf Proben, deren Nitrit-Werte die Schwelle von 5 nMol/ml mindestens einmal in 14 Tagen überschritten haben auch zur Gruppe der Proben mit der niedrigsten GAG-Produktion gehören. Umgekehrt weisen die Ansätze

mit den höchsten GAG-Werten die konstant niedrigsten Nitrit-Werte und damit sehr wahrscheinlich auch NO-Werte auf.

Eine weitergehende Interpretation der Daten ist möglich, wenn man die Integrale unter den Kurven der Nitrit-Kinetiken als Maß für die Gesamt-NO-Produktion direkt mit den GAG-Produktionswerten korreliert wie in Abbildung 26 geschehen. Die Auftragung erfolgt doppelt logarithmisch. Hier zeigt sich die Existenz einer Regressionsgeraden mit einer negativen Steigung, was bedeutet, dass die Netto-GAG-Produktion mit generell steigender NO-Produktion sinkt.

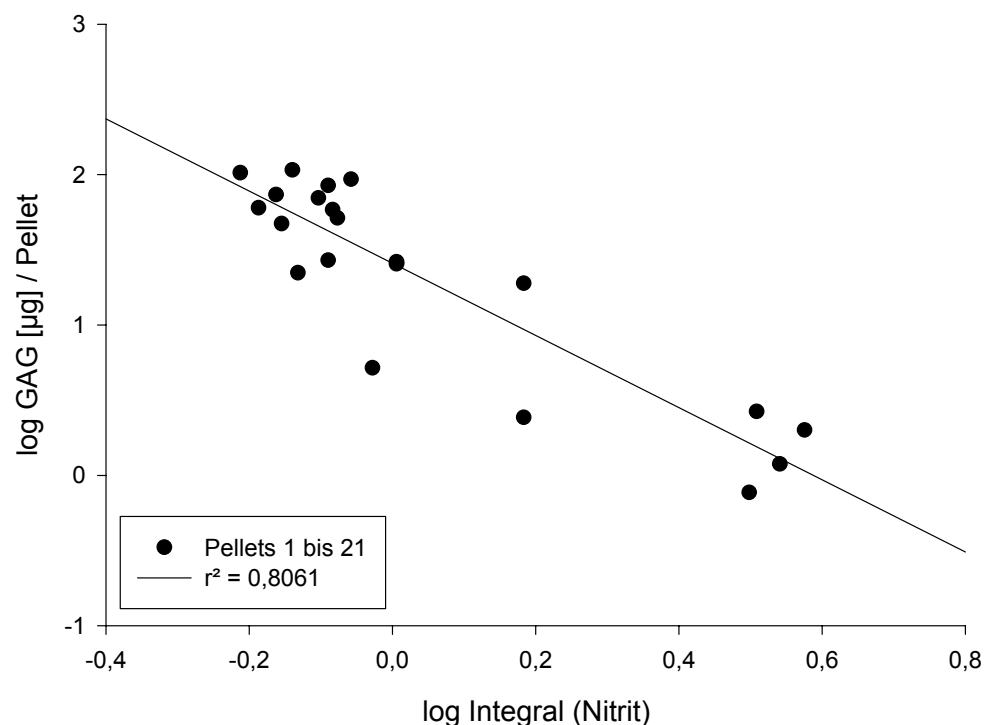


Abb. 26: Korrelation zwischen den Integralen unter den Kurven der Nitrit-Kinetiken und der GAG-Produktion aller 21 Pellets

Damit ergeben sich aus diesen Experimenten mehrere wichtige Schlussfolgerungen:

Isolierte und *in vitro* expandierte Chondrozyten produzieren nach Aggregation in einer *in vitro* Kultur offensichtlich ohne äußere Stimulierung mit Zytokinen Stickstoffmonoxid.

Die Menge des zeitweise gebildeten NO scheint die Bereitschaft der Kulturen zur GAG-Produktion dosisabhängig zu hemmen.

Es ergeben sich weitere Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der NO-Produktion und dem Knorpelabbau durch Apoptose.

4. Diskussion

Die vorliegende experimentelle Arbeit entstand im Rahmen einer am Universitätsklinikum Eppendorf durchgeführten Studie zur *in vitro* Herstellung von hyalinem Knorpel aus adulten Chondrozyten. Langfristiges Ziel dieses Projektes ist die nachhaltige Therapie von Gelenkoberflächenschäden durch Implantation eines kompetenten, autologen Knorpelgewebes.

4.1 Problemstellung und Lösungskonzept

Aufgabe der hier dokumentierten Untersuchungen war es, zunächst am Beispiel des adulten Minipigs die grundlegende Frage zu klären, ob aus der Gelenkfläche isolierte Chondrozyten eines erwachsenen Donors ihre besondere Fähigkeit zur Bildung eines dreidimensionalen Knorpelgewebes auch nach intensiver *in vitro* Vermehrung behalten. Dazu sollten konkret Beobachtungen der Gruppe um CANCEDDA und CASTAGNOLA aufgegriffen werden, die bereits die Differenzierung embryonaler Chondrozyten der Wachstumsfuge untersucht hatten (CANCEDDA et al., 1995, CASTAGNOLA et al., 1986, GENTILI et al., 1993 MURATOGLU et al., 1995). Diese Autoren stellten nämlich fest, dass sich diese Zellen auch noch nach Isolierung *in vitro* zur Synthese und Sezernierung der typischen Knorpelbausteine stimulieren ließen, wenn sie zuvor Gelegenheit zu intensiven Zell-Zell-Kontakten hatten. Damit wurde erstmals die Möglichkeit aufgezeigt, dass es zur Bildung eines dreidimensionalen Knorpelgewebes *in vitro* eine Alternative zur Verwendung von Polymervliesen (BUJIA et al., 1995, FREED et al., 1994, VACANTI et al. 1994, PETERSEN, 2003) geben könnte. Der wesentliche Unterschied liegt dabei weniger in dem Verzicht auf ein a priori unphysiologisches Material als vielmehr im Prozess der Besiedlung. Polymervliese lassen sich nur sehr langsam über Stunden in Suspensionskultur besiedeln bis eine für die Gewebebildung ausreichende Zellzahl und Zelldichte vorhanden ist. So wird der Nachteil hingenommen, dass proliferierende Zellen über eine längere Zeit neben solchen mit der Synthese von Kollagen und Glykosaminoglykanen befassten existieren. Damit ist ausgeschlossen, dass den Zellen ein für ihre Funktion optimales Milieu zur Verfügung gestellt werden kann. Weder kann dies der Experimentator, noch können dies die Zellen selbst, etwa durch Sezernierung eindeutig wirksamer parakriner Faktoren, weil jeweils die andere Funktion gehemmt würde. Möglicherweise ist dies der Grund, warum es nicht gelingt, hyalinen Knorpel

auf Polymervliesen zu züchten. Die Nutzung der juxtakrinen Signale zur Gewebekonstruktion bietet dagegen den Vorteil, dass die nicht miteinander vereinbaren Zellfunktionen – Proliferation und Matrixsynthese – zeitlich auseinander gehalten werden können. Dies gelingt, indem die isolierten Chondrozyten unter frei wählbaren Bedingungen eine ausreichende Zeit zur Proliferation stimuliert werden, um dann in ihrer Gesamtheit durch Wechsel der Kulturbedingungen und Intensivierung der Zell-Zell-Kontakte zur Matrixsynthese umgeschaltet zu werden. Der Erfolg dieser Zwei-Phasen-Methode steht und fällt allerdings mit der zur Intensivierung der Zell-Zell-Kontakte eingesetzten Technik und den konkret applizierten Kulturbedingungen. Die Entwicklung der Technik und die Optimierung der Kulturbedingungen waren daher beide zentrales Anliegen der hier vorliegenden experimentellen Arbeit.

4.2 Der Einsatz des Zwei-Phasen-Modells

Frisch aus der Gelenkfläche des Kniegelenkes vom Minipig isolierte Chondrozyten neigen spontan zur Aggregation, wenn sie an der Adhäsion mitogen wirkender Oberflächen gehindert werden, zum Beispiel durch Verwendung mit Agarose beschichteter Gefäße. Artikuläre Chondrozyten lassen sich in diesem differenzierten Zustand, definiert durch ihre Fähigkeit zur Synthese der Komponenten des hyalinen Knorpels, zwar monatelang ohne nennenswerten Verlust ihrer differenzierten Funktionen kultivieren (KIMURA et al. 1984, KOLETTAS et al., 1995, KUETTNER et al.), doch schließt dies gleichzeitig die Möglichkeit einer signifikanten Vermehrung *in vitro* aus (ABBOTT & HOLTZER, 1966, NAMEROFF & HOLTZER, 1967). Letzteres gelingt nur mit einer nennenswerten Proliferationsrate, wenn die Zellen an mitogenen Oberflächen adhären können und/oder mitogene Wachstumsfaktoren zugesetzt werden. Diese Beobachtungen werden bei der Applizierung der sogenannten Monolayer-Technik genutzt. Im konkreten Fall erwies sich der etablierte Zusatz von bFGF und EGF als sehr vorteilhaft (DE HAART et al., 1999, FUJISATO et al., 1996, GIANNOBILE, 1996, GUERNE et al. 1995, MACIAG et al., 1994, WROBLEWSKI & EDWALL-ARVIDSSON, 1995). So konnten isolierte Chondrozyten des Minipigs unter diesen Bedingungen in weniger als drei Wochen um den Faktor 300 vermehrt werden. Da diese Ergebnisse die gestellten Randbedingungen in hervorragender Weise erfüllten, wurden alle Experimente zur Knorpelbildung mit Chondrozyten durchgeführt, die zuvor nach dieser Vorschrift *in vitro* amplifiziert worden waren.

Zur Messung des Erfolgs bei der *in vitro*-Herstellung von artikulärem Knorpel stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die sich deutlich hinsichtlich Aufwand und Relevanz unterscheiden. Die ursprünglich geplante Bestimmung der Abgabe von Glykosaminoglykanen (GAG) an das Kulturmedium als Parameter für die Knorpelbildungsrate ist zwar zeitnah (jeweils bei Mediumwechsel) und technisch einfacher als die Bestimmung des GAG-Gehalts in den Gewebeproben, erwies sich aber als nicht immer eindeutig. Daher wurde im Verlauf der Experimente auf die vollständige Darstellung der GAG-Medienkonzentrationen verzichtet. Wichtigster Parameter ist der GAG-Gehalt der Pellets nach Beendigung des jeweiligen Experiments, gegebenenfalls bezogen auf den DNA-Gehalt als Maß für die Zellzahl. Ergänzt wurden diese Bestimmungen durch regelmäßige fotografische Darstellungen der gebildeten Gewebeproben und in einigen Fällen durch semiquantitative Immunblot-Nachweise des gebildeten Kollagentyps, um Schlussfolgerungen abzusichern.

Die bei dem Versuch der *in vitro* Herstellung von Knorpelgewebe beobachteten Phänomene lassen sich grundsätzlich zwei möglichen Ursachen zuordnen; einerseits schien die suboptimale Zusammensetzung des Kulturmediums verantwortlich zu sein, andererseits schien der Erfolg eher von der Anwendung einer geeigneten Technik abzuhängen. Diese beiden Bedingungen sollen im Folgenden besprochen werden.

Zuvor muss einem Aspekt Rechnung getragen werden, der weder auf die Aggregationstechnik noch auf die Kulturbedingungen Einfluss zu nehmen scheint. Bei dem vorgestellten Verfahren der Zellproliferation konnte in sieben Passagen ein Faktor von 300 erzielt werden. Vergleicht man in Abbildung 1 die Steigung zwischen den einzelnen Zellzahlen, erkennt man eine zunehmende Trägheit in der Proliferationsgeschwindigkeit der Chondrozyten mit steigendem Passage-Alter. In den hier vorgestellten Versuchen ist dem Alter der verwendeten Zellen keine Bedeutung beigemessen worden. Welchen Einfluss die Passagen-Zahl auf den späteren Erfolg bzw. das Ergebnis der *in vitro* Chondrogenese hat, kann nicht sicher beantwortet werden und muss Ziel weiterer Untersuchungen sein. Abbildung 24 belegt aber, dass das Alter der passagierten Zellen nicht allein entscheidend für ein Gelingen ist; die untersuchten Pellets aus Zellen einer einzigen Passage zeigen trotzdem GAG-Werte mit erheblichen Schwankungen, unabhängig von der Aggregations-Technik. Dennoch sollte die Anzahl der Passagen möglichst gering gehalten werden.

4.3 Optimierung der Technik der Chondrozytenaggregation

Ausgehend vom Zwei-Phasen-Modell sollten die amplifizierten Zellen möglichst schnell möglichst intensiven Kontakt bekommen. Mit einem eigens entwickelten Aggregationstest wurde herausgefunden, dass die *in vitro* amplifizierten Chondrozyten noch in der Lage sind, bei Kontakt spontan zu aggregieren und mit der Matrixsynthese zu beginnen. Die Ergebnisse dieser ersten Studien führten zu der Einsicht, dass das Ziel der Aggregation und Gewebebildung durch Sedimentation in einer Zentrifuge zu erreichen sein sollte.

Der Nachweis der Aggregationsfähigkeit frisch isolierter Chondrozyten in so genannten *high density*-Kulturen ist bereits beschrieben (SCHULZE-TANZIL et al., 2002). Allerdings eignet sich diese Methode der direkten Sedimentation zu Pellets nur für sehr kleine Zellmengen (ca. 10^4 pro Ansatz) für rein analytische Experimente. Wenn ein späterer therapeutischer Nutzen nicht ausgeschlossen werden sollte, musste die Methode auch mit wenigstens 10^6 bis 10^7 Zellen pro Ansatz funktionieren. Das Problem des drohenden Versorgungsmangels in größeren Zellpellets wurde durch einen Kompromiss gelöst. Die frisch sedimentierten Zellen wurden in einem kleinen Volumen (0,1 bis 0,2 ml) Medium resuspendiert und in einem konischen Gefäß der Aggregation durch Unterstützung der Schwerkraft (1 x g) überlassen.

Noch geringere Zelldichten stellten zwar auch geringere metabolische und mechanische Belastung der Zellen dar, führten aber bei der einsetzenden Synthese der Knorpelbausteine zu hohen Verlusten an das umgebende Medium. Höhere Zelldichten erwiesen sich ebenfalls als nachteilig, da sie offensichtlich schnell zu einem Ver- und/oder Entsorgungsmangel führen, wobei hier möglicherweise der Sauerstoffverbrauch limitierend ist. Als beste Lösung wurde eine Anfangszelldichte von 10^8 Zellen pro ml und anschließend ein möglichst schneller Austausch des Kulturmediums gefunden. Der Zeitpunkt des Mediumzusatzes nach Beginn der Sedimentation bei 1 x g erwies sich ebenfalls als kritisch. DNA-Analysen zeigten, dass ein zu früher Mediumwechsel die Gefahr der Resuspendierung der Zellen und damit der Verhinderung der Aggregation mit sich brachte, während ein zu später Mediumwechsel Zellverluste durch Nekrosen zu begünstigen schien. Eine Wartezeit von fünf Minuten zwischen dem Ende der Sedimentation und dem notwendigen Mediumwechsel erwies

sich gerade noch als technisch möglich und vom Ergebnis her als akzeptabel. Dies ist ein unerwartet kurzer Zeitraum, wenn man berücksichtigt, dass im Aggregationstest unter den gegebenen Bedingungen eine mittlere Aggregationszeit von 60 Minuten ermittelt wurde.

Als optimale Zellzahl für den Einsatz unter den gewählten technischen Bedingungen erwies sich mit vier Millionen Zellen pro Ansatz der höchste der ausgetesteten Werte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein positiver Einfluss parakriner Faktoren als Folge der Aggregation vermutet werden kann, der den mit steigender Zellzahl verschärfenden Versorgungsmangel überwiegen muss.

Gemäß den Forderungen des Zwei-Phasen-Modells mussten Aggregation und Matrixsynthese möglichst unter Ausschluss mitogener Bedingungen durchgeführt werden. Dies betraf nicht nur das Weglassen der mitogenen Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium, sondern auch die Vermeidung der unspezifischen Adhärerung der Zellen an den Oberflächen der Kulturgefäße. Versucht wurde dies durch Beschichtung mit Agarose.

Diese Technik scheint aus heutiger Sicht noch verbesserungswürdig. Schon mikroskopisch kaum sichtbare Risse in der Agarosebeschichtung reichen, wenigen Chondrozyten die Möglichkeit zum Kontakt mit der mitogenen Oberfläche der Wells und dem sichtbaren Effekt der Zellproliferation zu geben. Dieses Phänomen, dargestellt in den folgenden Abbildungen, ist erkennbar am morphologisch eindeutigen Erscheinungsbild fibroblastoider Zellen, wie man sie in Abbildung 2 während der Proliferation auch sieht.

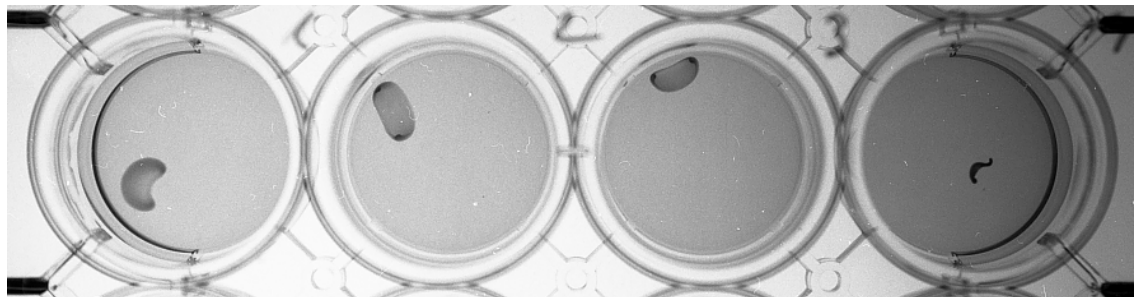


Abb. E: Pellets nach Zentrifugation in Agarose-beschichteten Wells; das vierte Pellet haftete früh am Boden des Wells und verliert rasch seine Größe gegenüber den drei anderen Pellets

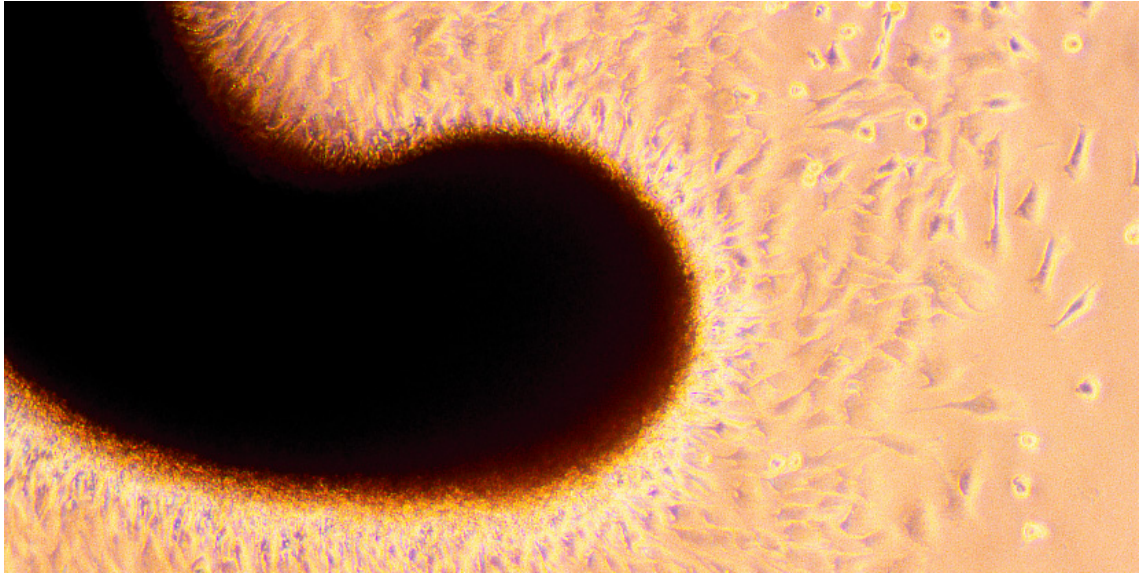


Abb. F: Mikroskopische Darstellung des vierten Pellets aus Abb. E; fibroblastoide Zellen expandieren vom Pellet aus in die Peripherie und bilden einen Monolayer, mitotische runde Zellen zeugen von Proliferation (vergl. Abb. 2)

Dieses Phänomen ist vermutlich mit einem Fehler in der Technik der Agarose-Beschichtung der Wells zu erklären. Frisch autoklavierte Agarose beginnt sofort abzukühlen, ihre Viskosität nimmt zu und sie verliert ihren flüssigen Aggregatzustand zugunsten eines festen. Beim Beschichten eines 6er-Wells wird aus diesem Grunde bei den letzten Wells kältere Agarose verwendet als bei den ersten Wells. Dies könnte die unvollständige Beschichtung der letzten Wells erklären, in denen sich durch die höhere Viskosität der Agarose eine vollständige Benetzung der Gefäßwände nicht mehr erzielen lässt. In Abbildung E ist das vierte Well mangelhaft beschichtet worden, was die hier beschriebenen Konsequenzen nach sich zieht.

4.4 Optimierung der Mediumzusammensetzung für die Knorpelbildung *in vitro*

Die Resuspendierung der sedimentierten Zellen hatte noch eine andere wichtige Funktion. Auf diesem Wege konnten leicht die bei der Aggregation effektiv störenden mitogenen Wachstumsfaktoren ausgewaschen werden. Bei der Wahl weiterer wichtiger Mediumkomponenten wurden vorhandene einschlägige Erkenntnisse genutzt. So wurde fetales Kälberserum bis zu einem Anteil von 10% zugesetzt, ebenso Cystein (TSCHAN et al., 1990) und Ascorbinsäure (NEYENS & BAEYENS, 2003, ZSUPAN, 1987) wie in der Literatur zu finden. Mit den verschiedenen durchgeführten Tests mit und ohne diese

Bestandteile wurden die bekannten Beobachtungen in den meisten Fällen bestätigt. Allerdings führten die Versuche zur Optimierung der Konzentration von Antioxidantien auch zu einer neuen wichtigen Erkenntnis. So zeigte sich die Wahl von NAC als Depotform für Cystein als völlig ungeeignet, sodass geschlossen werden muss, dass Antioxidantien in höheren Konzentrationen, die sich für andere Zellkulturen als vorteilhaft erwiesen haben, die Bildung von Knorpelgewebe stark hemmen. Die Vermutung, dass H_2O_2 wenn auch in nur sehr niedriger Konzentration essentiell für die Knorpelbildung zu sein scheint, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass auch keine Knorpelsynthese mehr möglich ist, wenn stets spontan vorhandene geringe Mengen von H_2O_2 im Kulturmedium durch extrazellulären Einsatz des Enzyms Katalase abgebaut werden. Dabei betrifft dieser Effekt nicht speziell die Aggregationsphase, sondern auch direkt die Synthese der Knorpelbausteine, denn auch bereits gebildeter Knorpel wird bei nachträglichem Zusatz von Katalase zum Kulturmedium stets rasch abgebaut. Für die Optimierung der Konzentration an Antioxidantien ergibt sich aus diesen Beobachtungen die konservative Forderung, die Konzentration von 1 mMol/l Cystein nicht wesentlich zu überschreiten.

4.5 Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) bei der *in vitro* Chondrogenese

Als ein zentrales Problem bei der Optimierung geeigneter Bedingungen für die *in vitro* Chondrogenese erwies sich die starke Tendenz des frisch gebildeten Knorpelgewebes im Laufe von 10 bis 14 Tagen wieder spontan zu degradieren. Stickstoffmonoxid (NO) gilt als Interleukin 1-induzierter Mediator des Knorpelabbaus bzw. der Apoptose (DING et al., 1988, GOLDRING et al., 2004, GUAN et al., 1998, VAN DE LOO et al., 1997). Andere Autoren beschreiben die Freisetzung von bFGF (basicfibroblast growth factor) aus den Chondrozyten, provoziert durch NO, was zu einer Degradierung artikulären Knorpels führt (SASAKI et al., 1998).

Messtechnisch und visuell konnte bestätigt werden, dass die unter NO-Einfluss kultivierten Pellets ihre typischen Merkmale für hyalinen Knorpel verloren. Histologisch zeigten sich Zeichen eines apoptotischen Zellsterbens.

Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Bildung von NO und der Knorpelproduktion finden sich bei der Beantwortung der Frage, ob Chondrozyten ohne

äußeren Einfluss, z.B. durch Zusatz von Interleukin-1 β , überhaupt in der Lage sind, relevante Mengen von NO zu produzieren. Dabei kann zunächst der Nachweis einer permanenten NO-Produktion aller Zellkulturen erbracht werden, auch dann, wenn sie maximale Mengen von GAG produzieren. Dies geschieht ohne den Einfluss kataboler Signale durch exogene Zytokine. Darüber hinaus kann ein zellgebildeter Nitrit-Schwellenwert im Kulturmedium ermittelt werden, der etwa bei 5 nMol/ml liegt. Bei Überschreiten dieses Wertes, steigt die Tendenz zur Apoptose und dem daraus resultierenden Zusammenbruch des Systems. KONDO et al. beschreiben schon 1993 den limitierenden Effekt selbst gebildeten NOs auf die Proliferation von Chondrozyten.

Die hohe Korrelation zwischen steigenden NO- und sinkenden GAG-Werten kann am Ende der hier vorgestellten Versuchsreihe deutlich gemacht werden. NO kann somit als Marker benutzt werden, drohenden Matrixabbau, in Form von Chondroitinsulfat-Verlusten, anzuzeigen. Treten im Medium NO-Mengen auf, die 5 nMol/ml erreichen, so kann dadurch ein Umkippen eines bis dahin gesunden Systems ausgelöst werden, dessen Eigendynamik im Detail aber noch verborgen bleibt.

4.6 Resumee und Ausblick

Nach der erfolgreichen Amplifikation frisch isolierter Chondrozyten am Modell des adulten Minipigs konnte mit den entsprechenden Nachweismethoden, wie der Bestimmung des GAG-Gehaltes der Pellets, ihrem DNA-Gehalt und dem semiquantitativen Immunblot-Nachweis des gebildeten Kollagentyps bewiesen werden, dass es gelingt, die Synthese von hyalinem Knorpel durch Aggregation der Zellen zu erzielen.

Das primäre Ziel dieser Arbeit, mit einer geeigneten Technik und unter Verzicht auf formgebende polymere Vliese, dreidimensionalen hyalinen Knorpel *in vitro* zu bilden, konnte damit zunächst erfüllt werden. Dies gelang über die Entwicklung der Aggregationstechnik hinaus durch die Optimierung der Konzentration von Antioxidantien in der Mediumzusammensetzung der kultivierten Pellets.

Andererseits wird der gewonnene Knorpel nach etwa einer Woche wieder abgebaut. Die in diesem Zusammenhang limitierende Rolle spontan gebildeten Stickstoffmonoxids

wurde als solche erkannt und bestätigt. Es konnte ein von exogenen parakrinen Faktoren unabhängiger Schwellenwert von 5 nMol NO/ml Medium ermittelt werden, dessen Erreichen zum Untergang der Knorpelmatrix (fallende GAG-Werte) durch programmierten Zelltod (fallende DNA-Werte) führt. Dieser einfach zu bestimmende NO-Schwellenwert kann als Indikator für den Zustand der Kulturen herangezogen werden.

Auf der Suche nach den Gründen für den spontanen Anstieg der NO-Produktion in den neu gebildeten Gewebeproben konnte der Grad der Differenzierung als Folge einer hohen Passage-Zahl eher ausgeschlossen werden. Auch eine fehlerhafte Agarosebeschichtung der Kulturgefäße kann nur in Einzelfällen für ein Misslingen der Knorpelbildung verantwortlich gemacht werden. Ebenso wenig ist ein Versorgungsmangel im statischen Kultursystem wahrscheinlich die Ursache, auch wenn sich durch Einsatz geeigneter dynamischer Bioreaktor-Systeme sicher eine weitere Optimierung erreichen lässt (MINUTH ET AL., 1992, NEHRING, 1996, PÖRTNER ET AL., 1998). So bleibt nur die Vermutung, dass es den Zellen nach einer initialen Phase der Gewebekonstruktion sehr wahrscheinlich einfach an chondrogenen Faktoren als Gegenspieler der NO-Produktion mangelt, wie sie unter *in vivo* Bedingungen normalerweise angetroffen werden. Dazu gehören etwa Signale der Mechanotransduktion wie auch endokrine und parakrine Faktoren wie zum Beispiel *insuline like growth-factor* (IGF) oder der *transforming growth-factor* (TGF) (HARDINGHAM ET AL., 1994, LOESER, 2000, VAN DER KRAAN ET AL., 2002). Da letztere bereits als rekombinate Proteine zur Verfügung stehen, ist ihr Einsatz als Mediumzusatz während der Chondrogenese-Phase zu empfehlen.

So bleibt abschließend zu sagen, dass für die in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Methoden bei Ergänzung durch chondrogene Faktoren gute Chancen bestehen, auch beständigen hyalinen Knorpel *in vitro* liefern.

5. Zusammenfassung

Die Reparatur hyalinen Knorpels in traumatisierten Gelenkflächen gilt auch in Zeiten des *tissue engineering*s als noch ungelöstes Problem. Protokolle unterschiedlicher Arbeitsgruppen propagieren zwar eine Vielzahl von Techniken zur Rekonstruktion autologen Knorpels, eine echte Wiederherstellung der Gelenkflächendefekte konnte aber bis heute nicht erzielt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte der Beweis erbracht werden, dass es auch unter Verzicht auf formgebende Polymervliese unter geeigneten Kulturbedingungen gelingt, ausgehend von *in vitro* expandierten und damit weitgehend dedifferenzierten Chondrozyten, extrakorporal hyalinen Knorpel herzustellen.

Im Rahmen der Optimierung der Kulturbedingungen stellte sich heraus, dass dieser Prozess neben der Ascorbinsäure auch von einer minimalen Konzentration an Wasserstoffperoxid abhängig zu sein scheint. In jedem Fall ist der Einsatz höherer Konzentrationen von Antioxidantien in dieser Gewebekultur eindeutig schädlich.

Wesentlicher Anteil am Erfolg der Knorpelbildung *in vitro* hat die Etablierung und der Einsatz eines Zwei-Phasen-Modells, in dem die unterschiedlich stimulierten Zellfunktionen Proliferation und Matrixsynthese nicht nebeneinander, sondern nacheinander geschaltet sind. Dies war die Voraussetzung dafür, dass sich juxtrakrine Signale durch Zell-Zell-Aggregation zur Bildung hyalinen Knorpelgewebes nutzen ließen. Technisch möglich wurde die ausreichende Intensivierung von Zell-Zell-Kontakten durch die Entwicklung eines eigenen Protokolls zur Zell-Aggregation.

Die Beobachtung, dass der unter Einhaltung der oben genannten Bedingungen gebildete Knorpel eine starke Neigung zeigte, im Laufe von 7 bis 10 Tagen spontan zu degradieren, wurde auf die Produktion von NO durch die beteiligten Chondrozyten zurückgeführt. Da sich auf Grund der Untersuchungen keine technischen Fehler als Grund für den spontanen Abbau des neugebildeten Knorpelgewebes ableiten ließen, ist eher ein Fehlen spezifischer chondrogener Signale anzunehmen, wie es *in vivo* etwa durch endokrine oder parakrine Faktoren möglich ist.

6. Literaturverzeichnis

- Abramson, S.B., Attur, M., Amin, A.R., Clancy, R. (2001). Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*: 3(6):535-541.
- Abbott, J., Holtzer, H. (1966). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. *J Cell Biol*; 28(3):473-487.
- Altman, R.D., Kates, J., Chun, L.E., Dean, D.D., Eyre, D. (1992). Preliminary observation of chondral abrasion in a canine model. *Ann Rheum Dis* 51: 1056-1062.
- Amirkhanian JD, Merritt TA (1998): Inhibitory effects of oxyradicals on surfactant function: utilising *in vitro* Fenton reaction. *Lung* 176 (1): 63-72.
- Archer, C.W., Morrison, E.H., Pitsillides, A. (1994). Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage. *J Anat* 184: 82-91.
- Archer, C.W., Morrison, E.H., Bayliss, M.T., Ferguson, M.W. (1996). The development of articular cartilage: II. The spatial and temporal patterns of glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans. *J Anat* 189: 23-35.
- Aulhouse, A.L. (1994). Prolonged exposure of human chondrocytes to ascorbic acid modifies cellular behavior in an agarose gel. *Anat Rec* 238: 31-37.
- Baumgaertner, M.R., Cannon, W.D. Jr., Vittori, J.M. (1990). Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clin Orthop* 253: 197-202.
- Benya, P.D., Schaffer, J.D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30: 215-224.

- Bert, J.M. (1993). Role of abrasion arthroplasty and debridement in the management of osteoarthritis of the knee. *Rheum Dis Clin North Am* 19: 725-739.
- Bobic, V. (1999). Die Verwendung von autologen Knochen-Knorpel-Transplantaten in der Behandlung von Gelenkknorpelläsionen. *Orthopäde* 28: 19-25.
- 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. *N Engl J Med* 331: 889-895.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Homminga, G., Nilsson, A., Isaksson, O., Peterson, L. (1997). A critical analysis of cartilage repair. *Acta Orthop Scand* 68 (2): 186-191.
- Buckwalter, J.A., Lohmander, S. (1994). Operative treatment of osteoarthrosis – current practice and future development. *J Bone Joint Surg* 76A: 1405-1418.
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage. *Instr Course Lect* 47: 477-504.
- Bujia, J., Wilmes, E., Krombach, F., Hammer, C., Kastenbauer, E. (1990). The effect of gammainterferon on HLA class II antigen expression on isolated human nasal chondrocytes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 247: 287-290.
- Bujia, J., Rotter, N., Minuth, W., Burmester, G., Hammer, C., Sittlinger, M. (1995). Cultivation of human cartilage tissue in a 3-dimensional perfusion culture chamber: characterization of collagen synthesis. *Laryngorhinootologie* 74: 559-563.
- Bullough, P.G. (1992). The pathology of osteoarthritis. In: Moskowitz, R.W. (Hrsg.). *Osteoarthritis. Diagnosis and medical/surgical management*, WB Saunders, Philadelphia: 39-70.
- Bursch, W., Kleine, L., Tenniswood, M. (1990). The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol.*68(9): 1071-1074.

- Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F., Castagnola, P. (1995). Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159: 265-357.
- Caplan, A.I. (1987). Bone development and repair. *Bioessays* 6: 171-175.
- Caplan, A.I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., Goldberg, V.M. (1997). Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 342: 254-269.
- Castagnola, P., Moro, G., Descalzi-Cancedda, F., Cancedda, R. (1986). Type X collagen synthesis during *in vitro* development of chick embryo tibial chondrocytes. *J Cell Biol* 102: 2310-2317.
- Castagnola, P., Dozin, B., Moro, R., Cancedda, R. (1988). Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in-vitro. *J Cell Biol* 106: 461-467.
- Chesterman, P.J., Smith, A.U. (1968). Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 50 (1): 184-197.
- Coutts, R.D., Woo, S.L., Amiel, D. (1992). Rip perichondrial autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Clin Orthop* 275: 263-273.
- Darr, D., Combs, S., Pinnel, S. (1993). Ascorbic acid and collagen synthesis: Rethinking a role for lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 307: 331-335.
- de Haart, M., Marijnissen, W.J., van Osch, G.J., Verhaar, J.A. (1999). Optimization of chondrocyte expansion in culture. Effect of TGF beta-2, bFGF and L-ascorbic acid on bovine articular chondrocytes. *Acta Orthop Scand.*;70(1):55-61.
- DePalma, A.F., McKeever, C.D., Subin, D.K. (1966). Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with triated thymidine. *Clin Orthop* 48: 229-242.

- Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J.(1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141(7):2407-2412.
- Dozin, B., Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R. (1992). *In vitro* differentiation of mouse embryo chondrocytes: requirement for ascorbic acid. *Eur J Cell Biol* 58: 390-394.
- Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barrett, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883 (2): 173-177.
- Freed, L.E., Grande, D.A., Lingbin, Z., Emmanuel, J., Marquis, J.C., Langer, R. (1994). Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable scaffolds. *J Biomed Mat Res* 28: 891-899.
- Frenkel, S.R., Toolan, B., Menche, D., Pitman, M.I., Pachence, J.M. (1997). Chondrocyte transplantation using collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 79 (5): 831-836.
- Fujisato, T., Saijki, T., Liu, Q., Ikada, Y. (1996). Effects of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold. *Biomater* 17: 155-162.
- Garrett, J.C. (1993). Osteochondral allografts. *Instr Cours Lect* 42: 355-358.
- Gentili, C., Bianco, P., Neri, M., Malpeli, M., Campanile, G., Castagnola, P., Cancedda, R., Cancedda, F.D. (1993). Cell proliferation, extracellular matrix mineralisation, and ovotransferrin transient expression during *in vitro* differentiation of chick hypertrophic chondrocytes into osteoblast-like cells. *J Cell Biol* 122: 703-712.

- Ghadially, F.N., Thomas, I., Oryschak, A.F. (1977). Long term results of superficial defects in articular cartilage. A scanning electron-microscope study. *J Pathol* 121: 213-217.
- Giannobile, W.V. (1996). Periodontal Tissue Engineering by growth factors. *Bone* 19 (1): 23-37.
- Gibson, G., Lin, D.-L., Roque, M. (1997). Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp Cell Res* 233: 372-382.
- Gillquist, J., Messner, K. (1997). A critical analysis of cartilage repair. *Acta Orthop Scand* 68 (2): 186-191.
- Goldring, M.B., Berenbaum, F., Buckwalter, J. (2004). The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandines and nitric oxide. *Clin. Orthop* 427 Suppl.: 37-46.
- Green, W.T. (1977). Articular cartilage repair: Behaviour of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop* 124: 237-250.
- Guan, Z., Buckmann, S.Y., Baier, L.D., Morrison, A.R. (1998). IGF-I and insulin amplify IL-1 beta-induced nitric oxide and prostaglandin biosynthesis. *Am J Physiol* 274 (4 Pt 2): F673-679.
- Guerne, P.A., Blanco, F., Kaelin, A., Desgeorges, A., Lotz, M. (1995). Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthr Rheum* 38: 960-968.
- Hardingham, T.E., Rayan, V., Lewthwaite, J.C. (1994). Regulation of cartilage matrix synthesis by chondrocytes. *Rev Rhum Ed Fr.* 15; 61: 93-98.

- Häuselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B. (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 107: 17-27.
- Häuselmann, H.J., Hunziker, E.B. (1997). Läsionen des Gelenkknorpels und ihre Behandlung. *Schweiz Med Wochenschr* 127 (46): 1911-1924.
- Häuselmann, H.J., Stefanovic-Racic, M., Michel, B.A., Evans, C.H. (1998). Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: Implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. *J Immunol* 160 (3): 1444-1448.
- Hendrickson, D.A., Nixon, A.J., Grande, D.A., Todhunter, R.J., Minor, R.M., Erb, H., Lust, G. (1994). Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 14 (4): 485-497.
- Howell, D.S. (1986). Pathogenesis of osteoarthritis. *Am J Med* 80: 24-28.
- Hunziker, E.B. (1992). Articular cartilage structure in human and experimental animals. In: Kuettner, K.F., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall, V.C. (Hrsg.). *Articular cartilage and osteoarthritis*, Raven Press, New York: 183-199.
- Hunziker, E.B., Rosenberg, L.C. (1996). Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg [Am]* 78-A(5): 721-733.
- Ishizaki, Y., Burne, J.F., Raff, M.C. (1994). Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture. *J Cell Biol* 126: 1069-1077.
- Italy, S., Abramovici, A., Nevo, Z. (1987). Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop* 220: 284-303.

- Iyoda, K., Miura, T., Nogami, H. (1993). Repair of bone defect with cultured chondrocytes bound to hydroxyapatite. *Clin Orthop* (288): 287-293.
- Johnson, L.L. (2002). Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop* 391:306-317.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 25: 239-257.
- Kim, W.S., Vacanti, J.P., Cima, L., Mooney, D., Upton, J., Puelacher, W.C., Vacanti, C.A. (1994). Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast Reconstr Surg* 94: 233-237.
- Kim, Y.J., Sah, R.L., Doong, J.Y., Grodzinsky, A.J. (1988). Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem* 174 (1): 168-176.
- Kimura, T., Yasui, N., Ohsawa, S., Ono K. (1984). Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop*. (186):231-239.
- Kolettas, E., Buluwela, L., Bayliss, M.T., Muir, H.I. (1995). Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J Cell Science* 108.
- Kondo, S., Ishiguro, N., Iwata, H., Nakashima, I., Isobe, K. (1993). The effects of nitric oxide on chondrocytes and lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 197(3):1431-1437.
- Kruger, T., Wohlrab, D., Birke, A., Hein, W. (2000). Results of arthroscopic joint debridement in different stages of chondromalacia of the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 120: 338-342.

- Kuettner, K.E., Memoli, V.A., Pauli, B.U., Wrobel, N.C., Thonar, E.J., Daniel, J.C. (1982). Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol* 93(3):751-757.
- Löhnert, J. (1998). Regeneration von hyalinem Knorpel im Kniegelenk durch Behandlung mit autologen Chondrozytentransplantaten. *Langenbeeks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115: 1205-1207.
- Loeser, R.F. (2000). Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology*. 37: 109-16.
- Lotz, M., Hashimoto, S., Kuhn, K. (1999). Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*: Jul;7(4): 389-391.
- Maciag, T., Zhan, X., Garfinkel, S., Friedman, S., Prudovsky, I., Jackson, A., Wessendorf, J., Hu, X., Gamble, S., Shi, J., Brown, S., Tarantini, F., Zimrin, A. (1994). Novel Mechanisms of fibroblast growth factor 1 function. *Rec Progr Horm Res* 49: 105-121.
- Mankin, H.J. (1974). The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis [Teil A]. *N Engl J Med* 291: 1285-1292.
- Mankin, H.J. (1974). The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis [Teil B]. *N Engl J Med* 291: 1335-1340.
- Mankin, H.J. (1982). The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg [Am]* 64 (3): 460-466.
- Mankin, H.J. (1994): Chondrocyte transplantation - one answer to an old question. *N Engl J Med* 331: 940-941.
- Martinek, V., Imhoff, A.B. (2003). Therapie von Knorpelschäden. *Dtsch Z Sportmed* 54 (3): 70-76.

- Meenen, N.M., Jüres, T.T., Adamietz, P., Lorke, D.E., Dallek, M., Jungbluth, K.H. (1993). Der Effekt von synthetischer Hydroxylapatitkeramik auf Langzeitkulturen isolierter Chondrozyten. *Unfallchirurgie* 19 (5): 257-266.
- Meenen, N.M., Rischke, B., Adamietz, P., Dauner, M., Fink, J., Göpfert, C., Rueger, J.M. (1998). Knorpeldefektbehandlung. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115: 568-576.
- Messner, K. (1999). Knorpelersatzoperationen mit vorkultivierten Zellen. *Orthopäde* 28: 61-67.
- Minuth, W.W., Stockl, G., Kloth, S., Dermietzel, R. (1992). Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables *in vitro* experiments under organotypic conditions. *Eur J Cell Biol* 57 (1): 132-137.
- Moran, M.E., Kim, H.K., Salter, R.B. (1992). Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion. *J Bone Joint Surg* 74B: 659-667.
- Mow, V.C., Rosenwasser, M. (1988). Articular cartilage: Biomechanics. In: Woo, S.L.-Y., Buckwalter, J.A. (eds). *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissue*. Park Ridge, IL, AAOS: 427-463.
- Muir, H.I. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. *BioEssays* 17, 1039-1048.
- Muratoglu, S., Bachrati, C., Malpeli, M., Szabó, P., Neri, M., Dozin, B., Deák, F., Cancedda, R., Kiss, I. 1995: Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte development stages. *Eur J Cell Biol* 68: 411-418.
- Nameroff, M., Holtzer, H. (1967). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. IV. Changes in polysaccharides produced by dividing chondrocytes. *Dev Biol.*;16(3):250-281.

- Nehring, D. (1996). Entwicklung von Reaktorsystemen zur Kultivierung von Gelenkflächenimplantaten aus Chondrozyten. Technische Universität Hamburg-Harburg, Diplomarbeit.
- Newman, A.P. (1998). Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* 26 (2): 309-324.
- Neyens, E., Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater.* 17, 98 (1-3): 33-50.
- Niethard, F.U., Pfeil, J. (1997). Orthopädie, 3. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- O'Driscoll, S.W. (1998). Current concepts review. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80 (12): 1795-1812.
- Pacifici, M. (1990). Independent secretion of proteoglycans and collagens in chick chondrocyte cultures during acute ascorbic acid treatment. *Biochem J* 272: 193-199.
- Petersen, J.P. (2001). Untersuchungen über den Einfluss von unterschiedlichen Seren und der Zelldichte auf die Chondrogenese auf Polymeroberflächen. Dissertation.
- Pörtner, R., Ghaussy, N., Adamietz, P., Meenen, N.M. (1998). Semi-continuous system for three-dimensional chondrocyte cultures. 1. International Workshop on Principles and Perspectives of Tissue Engineering for Basic and Applied Research, Hannover, Germany.
- Pridie, K.H. (1959). A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg (Br)* 41: 618-619.
- Rae, P.J., Noble, J. (1989). Arthroscopic drilling of osteochondral lesions of the knee. *J Bone Joint Surg* 71B: 534.
- Rand, J.A. (1991). Role of arthroscopy in osteoarthritis of the knee. *Arthroscopy* 7: 358-363.

- Reddi, A.H., Cunningham, N.S. (1991). Recent progress in bone induction by osteogonin and bone morphogenetic proteins: Challenges for biomechanical and tissue engineering. *J Biomech Eng* 113: 189-190.
- Robinson, D., Halperin, N., Nevo, Z. (1990). Regenerating hyaline cartilage in articular defects of old chickens using implants of embryonal chick chondrocytes embedded in a new natural delivery substance. *Calcif Tissue Int* 46: 246-253.
- Rudert, M., Wirth, C.J. (1997). Die Knorpelzelltransplantation. Experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. *Orthopäde* 26: 741-747.
- Sah, R.L., Trippel, S.B., Grodzinsky, A.J. (1996). Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res* 14: 44-52.
- Sams, A.E., Nixon, A.J. (1995). Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 3 (1): 47-59.
- Sasaki, K., Hattori, T., Fujisawa, T., Takahashi, K., Inoue, H., Takigawa, M. (1998). Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem (Tokyo)* 123(3):431-439.
- Schiller, A.L. (1995). Pathology of osteoarthritis. In: Kuettner, K.F., Goldberg, V.M., American Academy of Orthopaedic Surgeons (Hrsg.). *Osteoarthritic disorders*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont: 95-101.
- Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Villegas Castrejon, H., John, T., Merker, H.-J., Scheid, A., Shakibaei, M. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high density cultures. *Cell Tissue Res* 308:371–337.

- Shapiro, F., Koide, S., Glimcher, M.J. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 75A: 532-53.
- Silas, S.I. (1998). Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 80 (4): 743-744.
- Solursh, M. (1991). Formation of cartilage tissue *in vitro*. *J Cell Biochem* 45: 258-260.
- Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Briggs, K.K., Rodrigo, J.J. (1999). Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde* 28: 26-32.
- Steadman, J.R., Briggs, K.K., Rodrigo, J.J., Kocher, M.S., Gill, T.J., Rodkey, W.G. (2003) Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19(5):477-484.
- Stockwell, R.A. (1967). The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 101(4): 753-763.
- Studer, R.K., Georgescu, H.I., Miller, L.A., Evans, C.H. (1999). Inhibition of transforming growth factor beta production by nitric oxide-treated chondrocytes: implications for matrix synthesis. *Arthritis Rheum* 42 (2): 248-257.
- Tacchetti, C., Tavella, S., Dozin, B., Quarto, R., Robino, G., Cancedda, R. (1992). Cell condensation in chondrogenic differentiation. *Exp Cell Res* 200: 26-33.
- Thonar, E.J., Sweet, M.B. (1981). Maturation-related changes in proteoglycans of fetal articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 208A: 535-547.
- Tschan, T., Hoerler, I., Houze, Y., Winterhalter, K.H., Richter, C., Bruckner, P. (1990). Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. *J Cell Biol* 111 (1): 257-260.

- Vacanti, C.A., Kim, W.S., Schloo, B., Upton, J., Vacanti, J.P. (1994). Joint resurfacing with cartilage grown *in situ* from cell-polymer structures. *Am J Sports Med* 22: 485-488.
- van de Loo, F.A., Arntz, O.J., van den Berg, W.B. (1997). Effect of interleukin 1 and leukaemia inhibitory factor on chondrocyte metabolism in articular cartilage from normal and interleukin-6-deficient mice: role of nitric oxide and IL-6 in the suppression of proteoglycan synthesis. *Cytokine* 9 (7): 453-462.
- van der Kraan, P.M., Buma, P., van Kuppevelt, T., van den Berg, W.B. (2002). Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 631-637.
- Wakitani, S., Kimura, T., Hirooka, A., Ochi, T., Yoneda, M., Owaki, H., Ono, K., Yasui, N. (1989). Repair of rabbit articular surfaces with allografts of chondrocytes embedded in collagen gels. *J Bone Joint Surg* 71B: 74-80.
- Wroblewski, J., Edwall-Arvidsson, C. (1995). Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. *J Bone Min Res* 10: 735-742.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytology* 68: 251-306.
- Zsupan, I., Hadhazy, C., Nagy, V., Jeney, F., Nagy, I. (1987). The effect of OH(.) radicals generated by Fenton reaction on the growth and cartilage differentiation in limb bud cell culture. *J Submicrosc Cytol* 19 (3): 445-454.

7. Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre großartige Unterstützung.

Herrn PD Dr. Peter Adamietz danke ich für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung und vielen Diskussionen während der praktischen und theoretischen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Norbert Meenen (Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Hamburg, Prof. Dr. J. M. Rueger) danke ich für die enge Zusammenarbeit dieses fachübergreifenden Themas.

Besonders dankbar bin ich Ditte Siemesgelüss für die große Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche und die ausdauernde Hilfsbereitschaft bei der Analyse der Ergebnisse.

Ich danke Herrn Dr. Kay Körner und Herrn Dr. Joachim Riedewald für sachkundigen Rat und die Begutachtung der Dissertation.

Katharina danke für ihre Geduld mit mir und ihren ständigen Zuspruch.

Danke für Mara.

8. LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name	Till Wieman
Anschrift	Isestr. 111, 20149 Hamburg
Geburtsdatum	07. Januar 1970
Geburtsort	Köln
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1989	Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
------	---

Zivildienst:

1989 - 1991	als Rettungssanitäter
-------------	-----------------------

Hochschulbildung:

1992 - 1999	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
-------------	---

Beruf:

01.03.00 - 01.09.01	Arzt im Praktikum in der Orthopädischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhaus Barmbek (Prof. E. Hille)
01.09.01 - 31.08.02	Assistenzarzt in der Klinik für Unfallchirurgie des Johanniter-Krankenhaus der Altmark in Stendal (Dr. J. Schaper)
01.09.02 – 31.12.05	Assistenzarzt in der Klinik für Chirurgie des Städtischen Klinikums Lüneburg (Prof. A. Schafmayer)
seit 01.01.2005	Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik im Krankenhaus Buchholz (Dr. Fokuhl)

9. Erklärung

Ich versichere hiermit ausdrücklich, daß ich die vorliegende 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 als solche kenntlich gemacht habe.

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

Hamburg, 2005

.....

(Till Wieman)