

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
des Zentrums für operative Medizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. Wolfgang Rüter

**Die Chondrozyten-Periost – Kokultur:
Periostlappenexplantate modulieren den chondrozytären
Stoffwechsel in vitro**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Florian Klebig

aus Bremen

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 1.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. W. Rüther

Prüfungsausschuss, der 2. Gutachter: PD Dr. P. Adamietz

Prüfungsausschuss, der 3. Gutachter: Prof. Dr. J. Bruns

1	EINLEITUNG	5
1.1	Bedeutung und Behandlung von Knorpelschäden.....	5
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	11
2	MATERIAL UND METHODE	12
2.1	Zellkulturverfahren der Monokultur	12
2.1.1	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Chondrozyten	12
2.1.1.1	Isolierung von Chondrozyten	12
2.1.1.2	Kultivierung von Chondrozyten	13
2.1.1.3	Immunzytochemische Untersuchung der Chondrozyten auf Dedifferenzierungen	14
2.2	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Periostexplantaten.....	16
2.2.1	Isolierung von Periostexplantaten	16
2.2.2	Kultivierung von Periostexplantaten	17
2.2.3	Charakterisierung von Periostexplantaten	18
2.3	Aufbau, Installation und Charakterisierung der Chondrozytenmono- und der Chondrozyten-Periost – Kokultur.....	19
2.3.1	Technischer und apparativer Aufbau der Mono- und Kokultur	19
2.3.2	Installation der Chondrozyten – Mono- und der Chondrozyten-Periost - Kokultur	20
2.3.3	Ablauf der Chondrozyten – Monokultur und der Chondrozyten-Periost – Kokultur	21
2.3.4	Charakterisierung der Chondrozyten in der Chondrozyten – Monokultur und in der Chondrozyten-Periost – Kokultur	21
2.4	Proliferationsverhalten der Chondrozyten in der Monokultur und der Kokultur.....	22
2.4.1	DNA - Quantifizierung in der Mono – und Kokultur	22
2.5	Messung der extrazellulären Matrixproduktion in der Mono- und Kokultur.....	23
2.5.1	Anatomie und Grundlagen zur Messung der Proteoglykansynthese	23
2.5.2	Tests zur Messung der Proteoglykane	23
2.6	Grundlagen zum DMB-Assay zur Messung der Glykosaminoglykan (GAG)-Synthese	25
2.6.1	Tests zur Messung der Glykosaminoglykane (GAG)	25
2.7	Proteinbiosyntheseaktivität von extrazellulärer Matrix	26
2.7.1	Tests zur Messung der extrazellulären Matrix	27
2.8	Bestimmung von Kollagen Typ II in der Mono- und Kokultur.....	28
2.8.1	Untersuchung der Kollagensynthese	28
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Die technische Realisation und das Kultivierungsverfahren	30
3.2	Charakterisierung der Chondrozyten in Mono- und Kokultur.....	31
3.2.1	Lichtmikroskopie	31
3.2.2	Immunzytochemie	31
3.3	Periost.....	34
3.3.1	Lichtmikroskopie	34
3.3.2	Rot-Grün-Vitalitätstest	35

3.4	DNA-Quantifizierung bei der Mono- und Kokultur.....	36
3.5	Produktion der extrazellulären Matrix in der Mono- und Kokultur.....	37
3.5.1	Messung der Proteoglykansynthese mit Hilfe des Sulfateinbaus und des DMB-Assay	37
3.6	Messung der Proteinbiosynthese der Chondrozyten in der Mono- und Kokultur	39
3.7	Quantifizierung von Kollagen Typ II in der Mono- und Kokultur mit Hilfe des ELISA ...	40
4	DISKUSSION	41
4.1	Das in vitro Perfusionssystem.....	41
4.2	Periost unter Kulturbedingungen	42
4.3	Chondrozyten in der Monokultur und in der Kokultur mit Periostexplantaten	42
4.4	Einfluss von Periost auf die von Chondrozyten gebildete Extrazellulärmatrix	43
5	ZUSAMMENFASSUNG	46
6	LITERATURVERZEICHNIS	47
7	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	51
8	DANKSAGUNG	53
9	LEBENS LAUF	54

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Behandlung von Knorpelschäden

Unter Verletzungen und Schädigungen des hyalinen Gelenkknorpels leiden ca. 10 bis 12 Prozent aller Menschen (Sellards, Nho et al. 2002). Curl und Krome sahen in einer Serie von 31.516 Kniearthroskopien bei 19.827 Patienten insgesamt 53.569 Knorpelläsionen (Curl, Krome et al. 1997). 5 Prozent der arthroskopierten Patienten waren in einem Alter unter 40 Jahren. Andere Untersuchungen konnten isolierte Knorpelschäden in 1 bis 3 % aller arthroskopierten Patienten mit Kniegelenkbeschwerden (Hopkinson, Mitchell et al. 1985; Messner und Maletius 1996) nachweisen.

Als Schädigungsmechanismus des Gelenkknorpels kommen neben Traumata biomechanische Fehlbelastungen der Gelenke sowie endogen genetische und entzündliche Ursachen infrage (Sellards, Nho et al. 2002). Aufgrund der Avaskularität des hyalinen Gelenkknorpels, der Immobilität der Chondrozyten und der verminderten Proliferationsfähigkeit adulter Chondrozyten (Mankin 1982) ist eine Regeneration mit Wiederherstellung des originären Gelenkknorpels nicht möglich. Knorpelläsionen persistieren häufig als lokaler Defekt und können mittel- und langfristig in eine Arthrose münden (Convery, Akeson et al. 1972).

Prinzipiell können oberflächliche Läsionen innerhalb des Knorpelniveaus von tiefen Knorpeldefekten mit Eröffnung der subchondralen Knochenlamelle unterschieden werden. Bei den oberflächlichen chondralen Defekten, z.B. im Rahmen einer Abscherverletzung (flake fracture), verbleibt im weiteren Verlauf eine lokale Knorpelläsion. Bei den tiefen osteochondralen Defekten mit freiliegendem subchondralen Knochen kann es zu einer Defektheilung durch einwandernde mesenchymale Zellen aus dem Knochen beziehungsweise Knochenmark kommen (Shapiro, Koide et al. 1993; Buckwalter und Mankin 1998). Es kommt zur Ausbildung eines mechanisch und biochemisch minderwertigen Faserknorpels (Imhoff, Ottl et al. 1999). Dieses Regeneratgewebe zeigt typischerweise einen rascheren Verschleiß (Goymann 1999; Muller und Kohn 1999; Gelber, Hochberg et al. 2000). Mit zunehmender Defektgröße und zunehmendem Alter

steigt das Arthroserisiko signifikant an (Messner und Maletius 1996; Sahlstrom, Johnell et al. 1997; Gelber, Hochberg et al. 2000).

Die mangelnde Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels ist eng mit seinem histologischen Aufbau und seinen biomechanischen Aufgaben verknüpft. Hyaliner Knorpel besteht vereinfacht aus einer extrazellulären Matrix und einem zellulären Anteil, den Chondrozyten, die nur ca. 2% des Gesamtvolumens ausmachen (Stockwell und Meachin 1979). Der weit überwiegende Anteil des Gesamtvolumens besteht aus der von den Chondrozyten synthetisierten extrazellulären Matrix (Poole, Kojima et al. 2001). Diese wird zu etwa 60-70% aus Wasser und aus der Trockensubstanz gebildet, die sich aus den strukturformenden Kollagenen (Typ II, VI, IX und X) und den damit verbundenen Glykanen zusammensetzt (Lohmander 1988). Die Glykane bestehen aus Hyaluronsäure und Proteoglykanen, die durch ihren biochemischen Aufbau das hohe Wasserbindungsvermögen (Hydrophilie) und somit das biomechanische Verhalten des hyalinen Knorpels bestimmen (Junqueira und Carneiro 1996; Buckwalter und Mankin 1997; Buckwalter und Mankin 1998; Otte 2001; Poole, Kojima et al. 2001).

Das Kollagenetzwerk ist vor allem für die Reißfestigkeit und strukturelle Stabilität des hyalinen Knorpels verantwortlich. Die extrazelluläre Matrix und die Chondrozyten sichern zusammen die Elastizität des Gelenkknorpels und die Fähigkeit, starke Stoßbelastungen zu tolerieren und eine gegenüber Druck- und Scherkräften stabile, quasi reibungs- und abriebfreie Oberfläche zu bilden (Otte 2001).

Für fortgeschrittene oder ausgedehnte Knorpelläsionen und generalisierte Osteoarthrosen stehen gegenwärtig keine kausalen Therapieansätze zur Verfügung, so daß in vielen Fällen bei entsprechender klinischer Symptomatik mittelfristig ein endoprothetischer Gelenkersatz notwendig wird. Derzeit werden in Deutschland pro Jahr etwa 50.000 Kniegelenksendoprothesen implantiert, wobei die Tendenz in den letzten Jahren steigend ist (Wildner, Sangha et al. 2000).

Hingegen stehen bei umschriebenen Knorpeldefekten unterschiedliche operative Verfahren zur Verfügung, die zur Wiederherstellung einer tragfähigen Gelenkfläche führen sollen.

Es werden folgende Verfahren unterschieden:

- Verfahren der Faserknorpelinduktion:
 - Mikrofrakturierung (Steadman, Rodkey et al. 1999)
 - Knochen-Anbohrung (Pridie 1959)

- Transplantation von Knorpel-Knochen-Transplantaten:
 - Verwendung von autologen osteochondralen Transplantaten mit vollständiger Auffüllung des Defektes, die so genannte OCT (osteochondrale autologe Transplantation) (Wagner 1964; Helbing und Burri 1984)
 - Mosaikplastik, bei der mehrere kleine osteochondrale Zylinder transplantiert werden (Wagner 1964; Garrett 1986; Hangody, Kish et al. 1997; Imhoff, Ottl et al. 1999; Agneskirchner, Brucker et al. 2001; Laprell und Petersen 2001)

- Transplantation von Gewebe mit potenziell chondrogener Differenzierung:
 - Verwendung von chondrogenem Gewebe, dem Perichondrium oder Periost (O'Driscoll, Keeley et al. 1988; Ito, Fitzsimmons et al. 2001, O'Driscoll, Keeley et al. 1988; Homminga, Bulstra et al. 1990; Bruns und Steinhagen 1999; O'Driscoll und Fitzsimmons 2001; O'Driscoll, Saris et al. 2001).
 - Transplantation von autologen Chondrozyten (ACT) (Chesterman und Smith 1968; Bentley und Greer 1971; Brittberg, Lindahl et al. 1994; Peterson 1996).

Der Effekt der Mikrofrakturierung beruht auf einer Stimulation mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks, die aus eröffneten intraossären Blutgefäßen oder dem Knochenmark freigesetzt werden und sich in Knochen- oder Knorpelzellen differenzieren können (Caplan 1991). Ein vergleichbarer Mechanismus wird bei der Anbohrung des subchondralen Knochens beschrieben (Pridie 1959). Dabei wird der geschädigte Knorpel und die Knochenlamelle anterograd bis in den gut durchbluteten spongiösen Knochen angebohrt, um die Ausbildung einer Faserknorpeloberfläche anzuregen. Bei beiden Verfahren kann es zur Bildung eines Ersatzgewebes aus Faserknorpel kommen. Die

Kollagenstruktur wird dabei überwiegend durch Kollagen Typ I repräsentiert. Im Vergleich zum originären Knorpel ist von einer verminderten Belastbarkeit und einer beträchtlichen sekundären Mineralisationstendenz auszugehen (Pridie 1959; Johnson 1991; Wirth und Rudert 1996; Bouwmeester, Kuijer et al. 2002; Huntziker 2002).

Die autologe Knorpel-Knochen transplantation ist bis heute die einzige Methode, einen bestehenden Gelenkknorpeldefekt mit originärem hyalinen Knorpel zu decken (Bobic 1999). Bei dieser Methode werden mit Hilfe eines tubulären Entnahmeinstruments aus unbelasteten Bereichen oder Bereichen mit geringerer Druckbelastung Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen und in Defekte der Belastungszonen transplantiert (Wagner 1964; Helbing und Burri 1984; Imhoff, Ottl et al. 1999).

Jedoch ist die autologe Knorpel-Knochen transplantation auf kleine osteochondrale Defektdurchmesser von 25 – 30 mm limitiert, weil zum einen die Spenderareale begrenzt sind und zum anderen die stabile Press-fit-Verankerung bei größeren Defektgrößen nicht gewährleistet ist (Agneskirchner, Brucker et al. 2001).

Bei der Transplantation von autogenen Perichondrium- oder Periostlappen werden diese z.B. an der Rippe (Perichondrium) oder der Tibia (Periost) gewonnen und in den Defekt eingebracht. Diese Methode nutzt die Differenzierungsfähigkeit eines biologisch aktiven Gewebes, um den Defekt langsam postoperativ aufzufüllen (Rubak, Poussa et al. 1982; O'Driscoll, Keeley et al. 1988; Homminga, Bulstra et al. 1990; Bruns und Steinhagen 1999).

Bei diesem Reparaturverfahren können auch größere Defektzonen behandelt werden, wobei die geringe Verfügbarkeit des Transplantates limitierend ist. Des Weiteren besteht eine Ossifikationstendenz des Transplantates.

Die Transplantation autologer Chondrozyten (ACT) zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten stellt ein relativ neues Therapieverfahren dar (Brittberg, Lindahl et al. 1994). Das grundlegende Prinzip basiert auf der Gewinnung und Isolierung autologer Chondrozyten und der anschließenden Transplantation der Zellen in den Knorpeldefekt. Postuliert wird eine aktive zellvermittelte Reparation des Defektes mit Bildung eines hyalinartigen Knorpelgewebes, welches bislang noch nicht untersucht wurde.

Operationstechnisch wird bei der autologen Chondrozytentransplantation zunächst via Arthroskopie eine Knorpelbiopsie aus wenig belasteten Gelenkarealen gewonnen. Das Biopsat wird im Labor enzymatisch lysiert, die isolierten Zellen in Kultur gebracht und vermehrt. Nach 4-6 Wochen werden die Zellen resuspendiert. In einem zweiten operativen Eingriff wird zunächst der Knorpeldefekt bis in den gesunden Bereich hinein debridiert. Anschließend wird das Defektareal mit einem Periostlappen übernäht. In die so geschaffene „Kammer“ wird die autologe Zellsuspension injiziert (Brittberg, Lindahl et al. 1994; Brittberg, Tallheden et al. 2001) (Abbildung 1).

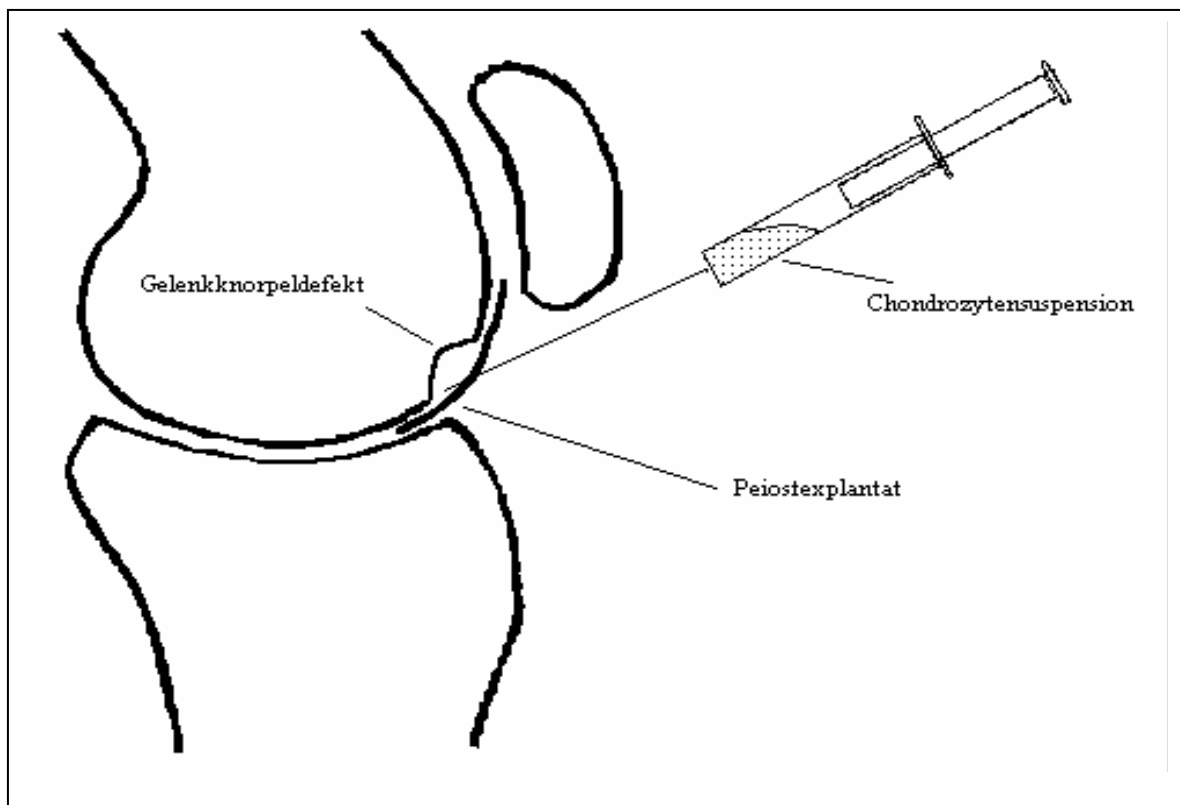


Abbildung 1 **Modell der autologen Chondrozytentransplantation**

Neben der mechanischen Deckung des Defektareals mittels Periost wird postuliert, daß das Periost unterschiedliche Voraussetzungen erfüllt:

- Periost ist ein chondrogenes Gewebe (Ham 1930),
- Periost enthält pluripotente mesenchymale Stammzellen (von Schroeder, Miura et al. 1994),
- Periost dient als Matrix, an die Zellen oder Wachstumsfaktoren anheften können (O'Driscoll, Recklies et al. 1994),
- Periost produziert bioaktive chondrogene Faktoren (O'Driscoll und Fitzsimmons 2001).

Diese Voraussetzungen sind derzeit jedoch nicht bewiesen.

Damit Periost diese postulierten Funktionen erfüllen kann, muss es von der Oberfläche des Knochens so gewonnen werden, dass die anatomischen Strukturen erhalten bleiben. Das Periost besteht aus zwei Bindegewebsschichten, dem Stratum fibrosum, die äußere, dem Knochen abgewandte Schicht, und dem Stratum osteogenicum (Kambiumschicht), die dem Knochen unmittelbar anliegt. Das Stratum fibrosum ist eine sehr faserreiche Schicht, die wenige Fibroblasten enthält. Die Kambiumschicht ist eine sehr zell-, nerven- und gefäßreiche Schicht, die neben Fibroblasten Knochenvorläuferzellen enthält (Junqueira und Carneiro 1996). Aufgrund des Gefäßreichtums ist das Periost wesentlich zur Ernährung und Erhaltung des Knochens verantwortlich (Basset 1962).

Die Präparation von geeigneten Periostexplantaten ist eine technisch anspruchsvolle Arbeit. Weiterhin bedarf das Annähen des Periostexplantates an den gesunden Knorpel großer Erfahrung. Die subchondrale Sklerosierung ist neben den oben genannten Risiken ein weiterer Risikofaktor, der das Outcome der Knorpelrekonstruktion beeinflusst.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Gelenkknorpelschäden in den großen Gelenken, insbesondere der unteren Extremitäten, stellen ein bedeutendes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar. Heute steht eine Reihe von Therapieoptionen zur Verfügung. Die Indikationen sowie die Resultate der einzelnen Verfahren differieren. Eine neue Methode hyalinen Knorpel zu bilden ist die autologe Chondrozytentransplantation (ACT), bei der Gelenkknorpeldefekte mit einem Periostlappen gedeckt und anschließend kultivierte Chondrozyten subperiostal transplantiert werden. Die Bedeutung des Periostlappens bei der autologen Chondrozytentransplantation ist unklar. Während Brittberg et al. dem Periost eine aktive Rolle bei der Chondrozytendifferenzierung beimessen, haben andere Arbeitsgruppen (Bentley, Biant et al. 2003; Bartlett, Skinner et al. 2005; Gooding, Bartlett et al. 2006) bei der ACT den Periostlappen durch eine Kollagenmembran ersetzt, ohne dass die klinischen Resultate abweichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Periostlappenexplantaten auf isolierte Chondrozyten in vitro zu untersuchen. Eine „einfache“ Übertragung der komplexen in vivo Situation bei der ACT ist nicht möglich. Mit Hilfe eines Kokultursystems sollte isoliert der Einfluss von Periostlappen auf die proteinbiosynthetische Aktivität der Chondrozyten untersucht werden. Weitere relevante Faktoren, z.B. die Bedeutung von Zell-Zell und Zell-Gewebekontakten wurden in dieser Arbeit zunächst bewusst unberücksichtigt gelassen.

2 Material und Methode

2.1 Zellkulturverfahren der Monokultur

2.1.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Chondrozyten

2.1.1.1 Isolierung von Chondrozyten

Die Gewinnung von Knorpelgewebe unter sterilen Bedingungen erfolgte von frisch geschlachteten Rindern aus den Metatarsophalangealgelenken. Nach dem Absetzen der Hufe am Metatarsophalangealgelenk wurde der Gelenkknorpel unter sterilen Kautelen mit einem Skalpell scharf abgekratzt und in Hank's Salzlösung (1) (Abb. 2) überführt, fein zerkleinert, in das Vorinkubationsmedium (2) überführt und für 1 h inkubiert. Nach zweimaliger Spülung der Knorpelstücke mit Transportmedium (1) und Inkubation für 6 h bei 37°C im Wasserbad im Dissoziationsmedium (3) wurde die gewonnene Zellsuspension durch einen Gaze-Filter (10µm) gefiltert und der Zellclot für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Zellen in einem Kultivierungsmedium (4) erfolgte das Zentrifugieren für 10 min bei 1000 x g.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer nach Vorverdünnung auf eine Dichte von 100.000 Zellen/cm² eingestellt. Nach der Bestimmung der Vitalität der Zellen durch den Zusatz von Trypan-Blau-Lösung im Verhältnis 1:1 erfolgte die Aussaat der Zellen mit einer Dichte, die 100.000 Zellen/cm² entsprach.

Medium und Ansätze

- (1) Transportmedium (HBSS-Spezial)
30 ml Hank's Balanced Salts (HBSS) (Life Technologies, Paisley, Schottland)
1 ml Penicillin/ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
1 ml Amphotericin (Biochrom, Berlin, Deutschland)

- (2) Vorinkubationsmedium
15 ml HBSS-Spezial (Life Technologies, Paisley, Schottland)
100 mg Hyaluronidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
70 mg Pronase (Sigma, Steinheim, Deutschland)

- (3) Dissoziationsmedium
10 ml Kultivierungsmedium
20 mg Collagenase (Sigma, Steinheim, Deutschland)

- (4) Kultivierungsmedium
90 ml HAM F-12 (Life Technologies, Paisley, Schottland)
10 ml Fetales Kälberserum (FKS) (GibcoBRL, Paisley, Schottland)
1 ml Penicillin/ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
1 ml Amphotericin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
9 mg Ascorbinsäurephosphat (5)
1,935 g Vitamin E

- (5) Ascorbinsäurephosphat
100 mg Ascorbinsäurephosphat (Sigma, Steinheim, Deutschland)
10 ml PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Abbildung 2 Medien und Ansätze zur Isolierung und Kultivierung von Chondrozyten

2.1.1.2 Kultivierung von Chondrozyten

Für die Kultivierung der Chondrozyten diente ein spezielles Kunststoffringsystem (Firma Minucells und Minutissue, Bad Abbach), welches aus einem schwarzen Basisring zur Aufnahme von herkömmlichen Deckgläsern und einem weißen Spannungsring zur Fixierung der Deckgläser bestand (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Nach dem sterilen Einsetzen der Deckgläser in die Ringträger erfolgte die Bestückung der Deckgläser mit Chondrozyten in einer Dichte von 100.000 Zellen/cm². Die mit Chondrozyten ausgesäten Ringträger wurden in 24er Wells platziert, für 1 – 2 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, danach vorsichtig mit Kultivierungsmedium (4) aufgefüllt und für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte die Überführung der Ringträger in die sterile Perfusionskammer (Minucells und Minutissue, Bad Abbach).

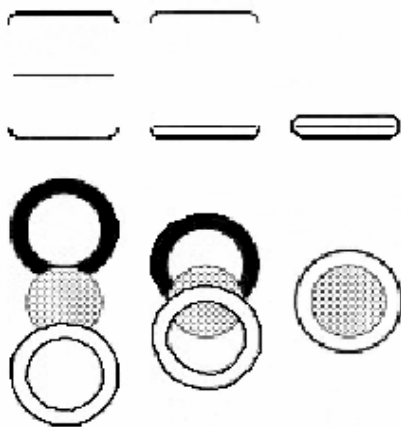


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Ringträger; Ansicht von der Seite und von oben (Originalabbildung Fa. Minucells und Minutissue)



Abbildung 4 Ringträger mit Membran (Originalabbildung Fa. Minucells und Minutissues)

2.1.1.3 Immunzytochemische Untersuchung der Chondrozyten auf Dedifferenzierungen

Zur Charakterisierung der Chondrozytenkulturen, insbesondere zum Nachweis von Dedifferenzierungen, diente die Durchführung immunzytochemischer Testreihen.

Diese Testreihen erfolgten nach unterschiedlich langer Kulturdauer mittels der auf Deckgläsern ausgesäten Monolayer. Dabei wurden die Chondrozyten zunächst mehrmals mit Tris-NaCl (1) gespült (Abbildung 5) und anschließend mit eisgekühltem Aceton bei 4°C im Kühlschrank für 10 min inkubiert. Nach weiteren Spülungen blockierte das zugegebene Rinderserum unspezifische Bindungsstellen, und der 1. Antikörper

(polyklonaler Mausantikörper gegen Typ-I bzw. Typ-II - Kollagen) konnte zugesetzt werden (Tabelle 1). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 60 – 90 min und endete mit weiteren Spülgängen.

Mit dem 2. Antikörper (monoklonaler Rattenantikörper gegen Mausantikörper) und dem 3. Antikörper (monoklonaler Ziegenantikörper gegen Rattenantikörper) (s. Tabelle 1) wurde für 30 min inkubiert und diese Inkubation ebenfalls durch Spülgänge mit Tris-NaCl (1) beendet. Nach der Färbung mit der DAB-Reagenz wurden die Deckgläser mit Hämalaum nach Meyer (1:1 mit aqua dest.) gegengefärbt und mit Aquatex eingedeckt. In den Negativkontrollen wurde der erste 1. Antikörper weggelassen.

Ansätze und Chemikalien	
(1) <u>Tris-NaCl</u>	
	250 ml Stammlösung
	400 ml 0,1 N HCl (1,0 m) (Merck, Deutschland)
	200 ml 9% NaCl (1,5)
	1510 ml aqua dest.
(2) <u>Tris-Stammlösung (Merck)</u>	
	24,23 g Trishydroxymethylaminomethan in
	1000 ml aqua dest. gelöst

Abbildung 5 Ansätze und Chemikalien zur immunzytochemischen Untersuchung

Antigen	Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Tertiärer Antikörper	Verdünnung
Typ I- Kollagen	Polyclonal Mouse- Anti-Typ I (Sigma)	1:500	Monoclonal Rabbit- Anti-Mouse (DAKO)	1:200	Monoclonal Goat-Anti- Rabbit (DAKO)	1:500
Typ II- Kollagen	Polyclonal Mouse- Anti-Typ II (DSHB)	1:100	Monoclonal Rabbit- Anti-Mouse (DAKO)	1:200	Monoclonal Goat-Anti- Rabbit (DAKO)	1:100

Tabelle 1 Antikörper zur Kollagentypisierung

2.2 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Periostexplantaten

2.2.1 Isolierung von Periostexplantaten

Die Gewinnung der Periostexplantate erfolgte vom Os metatarsale frisch geschlachteter Rinder. Unter sterilen Bedingungen wurde das Weichteilgewebe vorsichtig abpräpariert und das Periost freigelegt. Kleine Periostexplantate (Durchmesser von 10 mm) wurden mit einer zylinderförmigen Spezialstanze passförmig herausgestanzt und anschließend mit einem feinen Skalpell scharf vom Knochen abgeschoben. Die Kultivierung der gewonnenen Periostexplantate erfolgte nach Spülung in Hank's Salzlösung (1) und nach Überführung in das Kultivierungsmedium (2) (Abbildung 6).

2.2.2 Kultivierung von Periostexplantaten

Die in das Ringträgersystem zwischen zwei Membranen (Firma Milipore, 0,4 µm Porengröße) eingespannten Periostexplantate wurden in 24er Wells überführt, mit Kultivierungsmedium (2) aufgefüllt und für 24 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Überführung der Ringträger unter sterilen Bedingungen in die Perfusionskammer.

Medien und Ansätze	
(1)	<u>Transportmedium (HBSS-Spezial)</u> 30 ml Hank's Balanced Salts (HBSS) (Biochrom, Berlin, Deutschland) 1 ml Penicillin/ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) 1 ml Amphotericin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
(2)	<u>Kultivierungsmedium</u> 90 ml HAM F-12 (Biochrom, Berlin, Deutschland) 10 ml Fetales Kälberserum (FKS) (Life Technologies, Paisley, Schottland) 1 ml Penicillin/ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) 1 ml Amphotericin (Biochrom, Berlin, Deutschland) 100 µg/ml Ascorbinsäurephosphat (3) 21,5 mg/ml Vitamin E (4)
(3)	<u>Ascorbinsäurephosphat</u> 100 mg Ascorbinsäurephosphat (Sigma, Steinheim, Deutschland) 10 ml PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland)
(4)	<u>Vitamin E</u> 21,5 mg Vitamin E (Sigma, Berlin, Deutschland) 1 ml Ethanol

Abbildung 6 Medien und Ansätze zur Isolierung und Kultivierung von Periostexplantaten

2.2.3 Charakterisierung von Periostexplantaten

Periost besteht aus zwei Bindegewebsschichten, dem äußeren Stratum fibrosum und dem inneren Stratum osteogenicum (Kambiumschicht). Die Kambiumschicht ist mit dem Knochen über Kollagenfasern mit der Knochenmatrix verbunden.

Die mikroskopische Aufarbeitung sollte sicherstellen, dass die Periostexplantate aus beiden Bindegewebsschichten bestanden.

Mit dem Rot-Grün-Vitalitätstest wurde die Vitalität der benutzten Periostexplantate überprüft.

Die histologisch-mikroskopische Darstellung erfolgte, indem die Periostexplantate mit 4% Paraformaldehyd fixiert wurden. Für die Vitalitätsprüfung wurden die Periostexplantate mit der Färbestammlösung (1) (s. Abbildung 7) beträufelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem FITC-Filter betrachtet. Ethidiumbromid (1) bindet an die DNA von nicht intakten Membranen und lässt diese unter dem Fluoreszenzmikroskop rot angefärbt erscheinen. Mit dieser Methode konnte bei überwiegender Grünfärbung die Vitalität der Periostexplantate festgestellt werden.

Ansätze und Chemikalien	
(1)	<u>Färbestammlösung</u>
	5 µl Fluoresceindiacetat (FDA) (Sigma, Berlin, Deutschland)
	10 µl Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma, Berlin, Deutschland)
	500 µl PBS

Abbildung 7 **Ansätze und Chemikalien für Färbestammlösung**

2.3 Aufbau, Installation und Charakterisierung der Chondrozytenmono- und der Chondrozyten-Periost – Kokultur

2.3.1 Technischer und apparativer Aufbau der Mono- und Kokultur

Um den Einfluss von Periostexplantaten auf das Wachstum von Chondrozyten *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Kokultursystem mit Hilfe von in Reihe geschalteten Perfusionskammern benutzt. Die bislang bestandenen Schwierigkeiten, den direkten Einfluss von Periost auf Chondrozyten unter *in vitro* Bedingungen zu untersuchen, konnten mit diesem Modell egalisiert werden.

Der Aufbau der in dieser Arbeit benutzten Apparatur (s. Abbildung 8) sah wie folgt aus:

Das Kultivierungsmedium (4) (Abbildung 2) floss mit Hilfe einer Peristaltikpumpe aus dem Zuführungsbehälter in die erste Perfusionskammer, die unter Monokulturbedingungen unbestückt und unter Kokulturbedingungen mit Periost bestückten Ringträgern, befüllt war.

Nach einer Verweildauer des Kultivierungsmediums von 8 h in der ersten Perfusionskammer wurde dieses mit durchlaufender Peristaltikpumpe komplett in die zweite entleert.

Die zweite Perfusionskammer war mit den mit Chondrozyten bestückten Ringträgern sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur befüllt. Nach einer Verweildauer von 8 h in der zweiten Perfusionskammer gelangte das Kultivierungsmedium in einen Auffangbehälter.

Das Gesamtvolumen jeder Perfusionskammer (18 ml) wurde somit dreimal am Tag ersetzt. Mit Ausnahme der Peristaltikpumpe stand die gesamte Apparatur in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

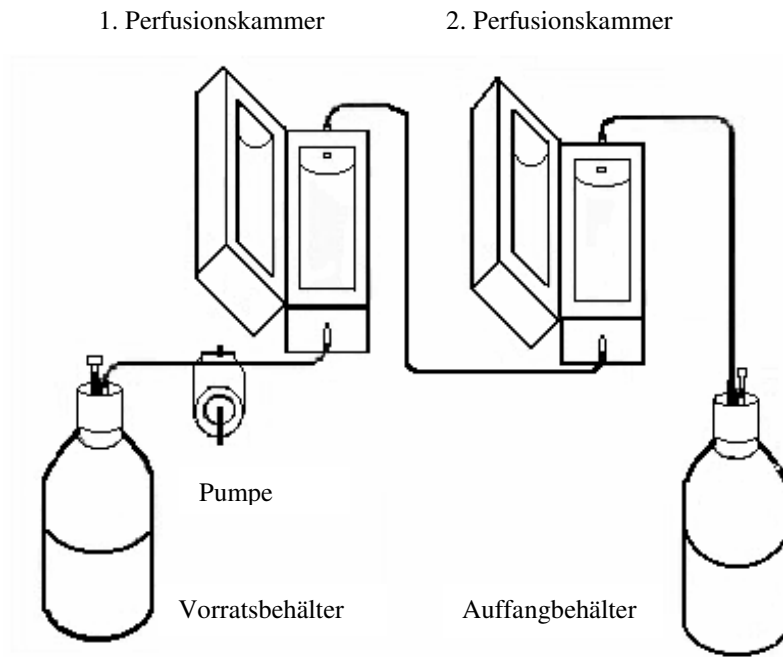


Abbildung 8 Modell des Perfusionskammersystems

2.3.2 Installation der Chondrozyten – Mono- und der Chondrozyten-Periost - Kokultur

Die Gewinnung der Chondrozyten geschah nach Standardverfahren, anschließend erfolgte die Kultivierung für 24 h in 24er Wells, wonach sich unter sterilen Bedingungen die Überführung der Chondrozyten in die Perfusionskammern anschloss.

Das gleiche Vorgehen fand für die Periostexplantate statt.

Das eine Perfusionskammersystem wurde als Kokultursystem benutzt (Gruppe K), indem in der ersten Perfusionskammer die Ringträger mit den Periostexplantaten und in der nachgeschalteten Perfusionskammer die Ringträger mit den Chondrozyten platziert wurden.

In der Vergleichsmonokultur (Gruppe M) blieb die erste Perfusionskammer unbestückt, die nachgeschaltete Perfusionskammer enthielt die mit Chondrozyten beladenen Ringträger.

Die Ausrichtung der Ringträger erfolgte jeweils mit dem weißen Ring gegen den Perfusionsstrom, um einheitliche Bedingungen des Nährmedieuanströmens zu gewährleisten.

Zu Vergleichszwecken erfolgte eine Kultivierung von Chondrozyten in den Wells unter stationären Bedingungen (Gruppe S).

2.3.3 Ablauf der Chondrozyten – Monokultur und der Chondrozyten-Periost – Kokultur

Die Kultivierungsdauer betrug für jede Versuchsanordnung 12 Tage. Die Bestimmung der Zellmorphologie und der Proliferation wurde neben einer Anfangskontrolle am 1., 2., 3., 4., 5., 7., 9. und 12.Tag vorgenommen, indem jeweils ein Ringträger mit Chondrozyten entnommen wurde. Das Gewinnen der Chondrozyten für die Morphologiebestimmung erfolgte, indem die Chondrozyten mit PBS von den Deckgläsern gelöst und bei -70°C eingefroren wurden. Die Proben für die Messung der Syntheseleistung der extrazellulären Matrix zum Ausgangszeitpunkt und zum Entnahmezeitpunkt am 12. Tag wurden jeweils direkt der jeweiligen Untersuchung zugeführt.

Der eine Teil der Periostexplantate wurde am Ende der Untersuchungsreihe in 4% Paraformaldehyd (s. 2.2.3) zur Konservierung und zur nachträglichen lichtmikroskopischen Untersuchung eingefroren, der andere Teil sofort dem Vitalitätstest zugeführt.

Zusätzlich wurden sowohl in den Perfusionskammern der Mono- und Kokulturen als auch in den Wells elektronisch die pH-Werte des Kultivierungsmediums jeweils am Anfang und am Ende der Versuchsreihe gemessen.

2.3.4 Charakterisierung der Chondrozyten in der Chondrozyten – Monokultur und in der Chondrozyten-Periost – Kokultur

Die Charakterisierung der Chondrozyten in der Mono- und Kokultur erfolgte mit Hilfe der Immunzytochemie (s. 2.1.1.3). Die Überprüfung der Periostlappenexplantate auf Vitalität fand mikroskopisch mit Hilfe des Rot-Grün-Vitalitätstestes (s. 2.2.3) statt.

2.4 Proliferationsverhalten der Chondrozyten in der Monokultur und der Kokultur

Die DNA-Quantitätsmessung wurde sowohl in der Gruppe K und Gruppe M als auch in der Gruppe S durchgeführt, um das Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter unterschiedlichen Kulturbedingungen zu erfassen.

2.4.1 DNA - Quantifizierung in der Mono – und Kokultur

Die DNA-Bestimmung der Mono- und der Kokultur erfolgte in Anlehnung an die Methode von Karsten und Wollenberger (Karsten und Wollenberger 1977). Grundlage dieser Methode ist die Fähigkeit von Ethidiumbromid, sich an bestimmte DNA-spezifische Sequenzen interkalierend anzulagern und über die Fluoreszenzmessung zu quantifizieren.

Die Chondrozyten wurden vorsichtig auf den Deckgläsern zweimalig mit PBS gewaschen, anschließend mit dem Zellschaber von ihrem Untergrund gelöst und durch einen weiteren Spülgang mit 1 ml PBS in ein Reagenzröhrchen überführt. Die Proben wurden dann für 5 min im Ultraschall lysiert und über Nacht eingefroren.

Am nächsten Tag wurde zu jeder Probe 0,5 ml Pronase und 0,5 ml RNase zugegeben, um Interferenzen mit Proteinen und RNA zu vermeiden. Nach der Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 30 min wurde jeder Probe 0,5 ml Ethidiumbromid zugesetzt und für weitere 30 min inkubiert.

Standardwerte konnten durch Austausch der Probe mit 1 ml Rhodamin, Leerwerte durch Austausch der Probe mit 1 ml PBS ermittelt werden.

Anschließend konnte am Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{EX} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 590 \text{ nm}$) die DNA-Menge gemessen werden.

2.5 Messung der extrazellulären Matrixproduktion in der Mono- und Kokultur

2.5.1 Anatomie und Grundlagen zur Messung der Proteoglykansynthese

Proteoglykane haben im hyalinen Knorpel eine biologische Halbwertszeit von 20-200 Tagen. Kollagene hingegen bleiben über Jahre bis Jahrzehnte stabil (Junqueira und Carneiro 1996). Somit eignen sich vor allem die Proteoglykane für eine quantitative Analyse einer veränderten Matrixproduktion. Ein Proteoglykanmolekül besteht aus einem fadenförmigen zentralen Protein (core protein), an das zahlreiche, unverzweigte, sulfatierte Seitenketten über eine O-Glykosylierung und N-Glykosylierung geknüpft sind. Die Glykosaminoglykane bestehen vorwiegend aus Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat. Sulfat stellt somit einen essentiellen Baustein für die Glykosaminoglykane dar.

Bei der Messung der Proteoglykane wird radioaktiv markiertes Sulfat ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$) anstelle des essentiellen Bausteines Sulfat in den Proteoglykanen gemessen.

Den Chondrozyten fügt man in vitro radioaktiv markiertes Sulfat ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$) hinzu, so dass das Isotop primär in die Proteoglykanmoleküle eingebaut wird und durch einen Detektor quantifiziert werden kann. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Proteoglykansynthese der Chondrozyten quantitativ zu bestimmen.

2.5.2 Tests zur Messung der Proteoglykane

Die Inkubation der Mono- und Kokulturen mit Kultivierungsmedium (4) (Abbildung 2) und $10 \mu\text{Ci Na}_2^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (1) pro ml Kultivierungsmedium (Abbildung 9) fand für 8 h bei 37°C statt. Die Überstände wurden abgezogen und für 24 h in einem Reagenzglas gesammelt. Nach Zugabe von Trypsin (2) (Abbildung 9) und Inkubation für 10 min. bei 37°C zum Lösen der Monolayer bewirkte das Zentrifugieren eine Trennung der Proben in ihre zellulären und extrazellulären Komponenten. Hierbei werden Moleküle kleiner als MW 3000 von denen größer MW 3000, die aus der extrazellulären Matrix stammen, separiert (Junqueira und Carneiro 1996). Hierzu wurden der Überstand und die Zellpellets

jeweils bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert, das Zentrifugenröhrchen umgedreht, jeweils 0,5 ml PBS hinzugegeben und erneut für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Danach wurden die Proben gevortext (kräftige Durchmischung), 200 µl jeder Probe mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Anschließend konnten die Proben in einem β-Detektor gemessen werden.

Ansätze und Reagenzien	
(1)	<u>Radioaktiv markiertes Sulfat ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$)</u> 10 µCi/ml Medium (Firma Amersham, Braunschweig, Deutschland)
(2)	<u>Papain-Lösung</u> 176 mg 0,01 M Cystein 0,125 mg/ml Papain (Sigma, Berlin, Deutschland) 100 ml PBE-Stammlösung
(3)	<u>PBE-Stammlösung</u> 14,2 g/l 0,1 M Na_2HPO_4 3,36 g/l 0,01 M Na_2EDTA in 1 l aqua dest.

Abbildung 9 **Ansätze und Reagenzien zur quantitativen Analyse der extrazellulären Matrixproduktion über den Sulfateinbau**

2.6 Grundlagen zum DMB-Assay zur Messung der Glykosaminoglykan (GAG)-Synthese

DMB (1,9-Dimethylmethylenblausäurechlorid) misst den Glykosaminoglykananteil der Proteoglykane durch Bindung von sulfatierten Glykosaminoglykanen und erzeugt eine Metachromasie (Taylor und Jeffrey 1969)

Der DMB (1,9-Dimethylmethylenblausäurechlorid)-Assay, von Farndale in Bezug auf die Selektivität von sulfatierten Glykosaminoglykanen modifiziert, misst spektrometrisch den Glykosaminoglykananteil der Proteoglykane (s. Abbildung 10) (Farndale, Sayers et al. 1982). Hierbei färbt der DMB-Assay speziell sulfatierte Glykosaminoglykane, Chondroitinsulfat und Keratansulfat, an. Die Messung erfolgt spektrometrisch und nutzt das Anfärbeverhalten aus.

2.6.1 Tests zur Messung der Glykosaminoglykane (GAG)

Die PBE-Stammlösung **(1)** (Abbildung 10) diente zur Verdünnung und zum Waschen der Mono- und Kokulturproben. Danach wurden die Proben mit der auf 37°C zum pipettieren erhitzten Verdauungslösung **(2)** (Abbildung 10) versetzt und für 12-16 h bei 60°C zum Lysieren inkubiert. Anschließend versetzte 2 ml DMB-Lösung **(3)** (Abbildung 10) jeweils 20 µl der Probe des verdauten Knorpels. Dem Überstand wurde 800 µl DMB-Lösung **(3)** pro 80 µl Probe hinzugefügt und nach 8 h die Absorption bei 525 nm im Ultraviolettspektrometer gemessen. Die Kalibrierung des DMB-Assay erfolgte mit Chondroitin-6-sulfat-Lösung **(4)** (Abbildung 10) nach einem absteigenden Verdünnungsschema.

Ansätze und Reagenzien	
(1)	<u>PBE-Stammlösung</u> 14,2 g/l 0,1 M Na ₂ HPO ₄ 3,36 g/l 0,01 M Na ₂ EDTA in 1 l aqua dest.
(2)	<u>Papain-Lösung</u> 176 mg 0,01 M Cystein 0,125 mg/ml Papain (Sigma, Berlin, Deutschland) 100 ml PBE-Stammlösung
(3)	<u>DMB-Lösung</u> 16 mg 1,9-Dimethylmethylenblauschlorid 10 ml Ethanol 2,37 g NaCl (0,04 M) 3,04 g Glycin 85 ml 0,1 M HCl auf ein Gesamtvolumen von 1 l mit pH-Wert von 3,0
(4)	<u>Chondroitin-6-sulfat</u>

Abbildung 10 Ansätze und Reagenzien zur quantitativen Analyse der extrazellulären Matrixproduktion

2.7 Proteinbiosyntheseaktivität von extrazellulärer Matrix

Chondrozyten sind organellenreich, v.a. an rauhem endoplasmatischem Retikulum und großen Golgi Komplexen. Dieses weist auf eine hohe Aktivität der Zellen in der Proteinbiosynthese hin (Junqueira und Carneiro 1996). Chondrozyten produzieren große Mengen von Proteoglykanen und Kollagen vom Typ-II, die Extrazellulärmatrix (Scully, Lee et al. 2001). Eine der wichtigsten Aminosäuren dieser Proteine ist das Prolin (Junqueira und Carneiro 1996). Die Bestimmung erlaubt eine annähernde Aussage über die Biosyntheseaktivität der Chondrozyten.

Zur quantitativen Bestimmung des Kollagenanteils im Knorpel kann die Messung von Prolin als Maß der Kollagensynthese herangezogen werden. Gibt man Chondrozyten radioaktiv markiertes ^3H -Prolin hinzu, wird das Isotop primär in die Kollagenmoleküle eingebaut und kann durch einen Detektor quantifiziert werden. Auf diesem Weg kann über die ^3H -Prolin-Einbaurrate die Kollagensyntheseleistung semiquantitativ bestimmt werden.

2.7.1 Tests zur Messung der extrazellulären Matrix

Die Inkubation der Mono- und Kokulturen mit Kultivierungsmedium (4) (Abbildung 2) und $10\ \mu\text{Ci}$ ^3H -Prolin pro ml Kultivierungsmedium (1) (Abbildung 9) fand für 8 h bei 37°C statt. Die Überstände wurden abgezogen und in einem Reagenzglas für 24 h gesammelt. Danach wurden die Proben für $3 \times 20\ \text{min}$ mit 1 mM nicht radioaktivem Prolin und PBS gewaschen. Nach dem Spülen erfolgte die Verdauung über Nacht bei 65°C mit jeweils 1 ml/Probe Papain-Lösung (2) (Abbildung 11). Anschließend fand ein weiteres Vortexen der Proben statt, wonach $200\ \mu\text{l}$ jeder Probe mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem β -Detektor gemessen wurde.

Ansätze und Reagenzien	
(1)	<u>Radioaktiv markiertes Prolin</u> 10 $\mu\text{Ci/ml}$ Medium (Firma Amersham, Braunschweig, Deutschland)
(2)	<u>Papain-Lösung</u> 176 mg 0,01 M Cystein 0,125 mg/ml Papain (Sigma, Berlin, Deutschland) 100 ml PBE-Stammlösung
(3)	<u>PBE-Stammlösung</u> 14,2 g/l 0,1 M Na_2HPO_4 3,36 g/l 0,01 M Na_2EDTA in 1 l aqua dest.

Abbildung 11 **Ansätze und Reagenzien zur quantitativen Analyse der extrazellulären Matrixproduktion über den Prolineinbau**

2.8 Bestimmung von Kollagen Typ II in der Mono- und Kokultur

Grundlagen des ELISA für Kollagen Typ II

Die Technik des ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nutzt die Bindungsaffinität spezifischer Antikörper, die gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet sind und an eine Trägersubstanz gebunden vorliegen. Diese Enzymkomplexe können durch einen enzymmarkierten Anti-Antikörper und durch Zugabe eines chromogenen Substrats sichtbar gemacht und somit die Antigenkonzentration photometrisch bestimmt werden.

2.8.1 Untersuchung der Kollagensynthese

Für die Messung der Syntheseleistung des Kollagen Typ II diente ein kommerziell erhältlicher ELISA (Capture ELISA KIT, Chondrex Inc., Redmond, USA), der speziell gegen Rinderantigen bindet (Terato und al. 1996).

Zur Präparation der Monolayer wurde zuerst das Kultivierungsmedium entzogen, 0,5 ml Essigsäure (1) (Abbildung 12) und 50 µl Pepsin-Lösung (2) zum Verdauen des Kollagens über Nacht bei 4°C hinzugegeben. Parallel dazu wurde ein polyklonaler Anti-Typ-II - Kollagen-Antikörper mit 10 ml Verdünnungspuffer (1) angesetzt, 100 µl/Well in eine 96er ELISA Platte pipettiert und für 10 h bei 4°C inkubiert.

Nach 24 h erfolgte die Behandlung der Monolayer. 50 µl der TSB (3) und 50 µl der Pankreas-Elastase (4) wurden jeweils hinzugefügt und für 30 min bei 35°C inkubiert. Nach Aufnahme der Zellsuspension erfolgte die Zentrifugation bei 10.000 U/min für 5 min, danach erfolgte eine Verdünnung des Überstandes auf 1:20 mit Aqua dest..

Die Referenzprobe, der Kollagen-Standard, wurde in der Pepsin-Lösung (2) in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 0,05 – 2 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl der Proben und des Kollagen-Standards wurden in die Wells pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Sowohl die Proben als auch der Kollagen-Standard wurden nacheinander mit 1 vial Biotinylated mAb in 10 ml TSB (3) gelöst, jeweils 100 µl/Well hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Eine Tablette Citratphosphatpuffer wurde in 20 ml Aqua dest. gelöst und mit einer Tablette OPD kurz vor der Messung

versetzt. Sowohl das Well der Proben als auch des Kollagen-Standards wurden mit 100 μ l aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde enzymatisch beendet, und die anschließende Messung im Photospektrometer bei 490 nm durchgeführt.

Ansätze und Reagenzien	
(1)	<u>Essigsäure</u> 0,05 M Essigsäure
(2)	<u>Pepsin-Lösung</u> 1mg/ml Pepsin in 0,05 M Essigsäure (1)
(3)	<u>TSB</u> 1,0 M TRIS 2,0 M NaCl 50 mM CaCl ₂ (pH 8,0 mit 1 N NaOH)
(4)	<u>Pankreas-Elastase</u> 1:10 TSB (3) 1 mg/ml Pankreas-Elastase

Abbildung 12 Ansätze und Reagenzien des Kollagen Typ II - ELISA

3 Ergebnisse

3.1 Die technische Realisation und das Kultivierungsverfahren

Der Gelenkknorpel wurde aus den Metatarsophalangealgelenken von einjährigen Rindern gewonnen (2.1.1.1). Die Präparation erfolgte unter sterilen Kautelen, so daß mittels des Dissoziationsverfahrens (s. 2.1.1.1), die für die Versuchsdurchführung benötigten Chondrozyten gewonnen werden konnten. Die anschließende Vorkultivierung führte zur notwendigen Adhärenz auf den Ringträgern, die kontaminationsfrei in die Perfusionskammern eingebracht, bzw. aus den Kammern entnommen werden konnten. Im Anschluß konnten bestimmte Ringträger den lichtmikroskopischen und immunzytochemischen Untersuchungen sofort zugeführt werden.

Die Verwendung eines in Reihe geschalteten Perfusionssystems gestattete einen bislang in anderen Versuchsaufbauten nicht durchführbaren direkten Einfluß eines Gewebes auf ein kokultiviertes Gewebe. Die Kokultivierung von Periostexplantaten und Chondrozyten unter Perfusionsbedingungen ergab gleichbleibende Bedingungen im Hinblick auf den pH-Wert. Hier zeigte sich unter Perfusionsbedingungen eine annähernde Konstanz des pH-Wertes der Anfangs- und Endproben der zehntägigen Versuchsreihe. Ein Abfall des pH-Wertes in den azidotischen Bereich ließ sich nur unter stationären Bedingungen beobachten (s. Tabelle 2).

Hiermit ist der Vorteil eines Perfusionssystems im Vergleich zu einem stationären System ersichtlich.

Zusätzlich erfolgte die Kultivierung, indem der gesamte Versuchsaufbau in den Inkubator verlagert wurde, um gleich bleibende Umgebungsbedingungen zu gewährleisten.

Die Präparation der Chondrozyten gestaltete sich komplikationslos.

Ausgangsmedium	Chondrozyten in Perfusion	Chondrozyten stationär	Chondrozyten-Periost in Perfusion
pH 7,45	pH 7,42	pH 7,09	pH 7,38

Tabelle 2 pH-Durchschnittswerte nach 10 Tagen unter stationären und Perfusionsbedingungen (n=5)

3.2 Charakterisierung der Chondrozyten in Mono- und Kokultur

3.2.1 Lichtmikroskopie

Die Chondrozyten bildeten auf den Deckgläsern Monolayer bei einer Aussaatdichte von 100.000 Zellen/cm². Lichtmikroskopisch fiel die polygonale Zellform ohne polare Ausrichtung auf.

Nach 4-5 Tagen zeigten sich die Monolayer als konfluenter Zellrasen. Das morphologische Bild der Chondrozyten blieb lichtmikroskopisch für 8-10 Tage sowohl unter Mono- als auch unter Kokulturbedingungen einheitlich. Ab dem 10. Kultivierungstag nahmen die Zellen zunehmend Spindelform im Sinne einer fibroblastären Dedifferenzierung mit deutlicher bipolarer Ausrichtung an. Dieser Prozess begann stets in der Peripherie der Deckgläser und schritt zentripetal fort.

3.2.2 Immunzytochemie

Die durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen konnten qualitativ die Verteilung und Lokalisation der extrazellulären Kollagene darlegen. Die Kontrolluntersuchungen ohne Zugabe des 1. Antikörpers (s. 2.1.1.3) blieben ohne Anfärbung mit der DAB-Reagenz.

Bereits nach 48 h konnten in den Zellkulturen unter Mono- und Kokulturbedingungen netzartige Kollagenstrukturen vom Typ II nachgewiesen werden.

Qualitativ ließ sich Kollagen Typ II in der Monokultur nach dem 10. Kultivierungstag stärker anfärben als in der Kokultur mit Periost. Die Dedifferenzierung war qualitativ ausgeprägter in der Kokultur nachweisbar, in der die Anfärbbarkeit von Kollagen Typ I stärker positiv war, als in der Monokultur.

Nebenbefundlich zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster von Kollagen Typ II, welches in der Kokultur primär zentral zu erkennen war, wohingegen Kollagen Typ I in der Monokultur überwiegend zentral ausgeprägt war.

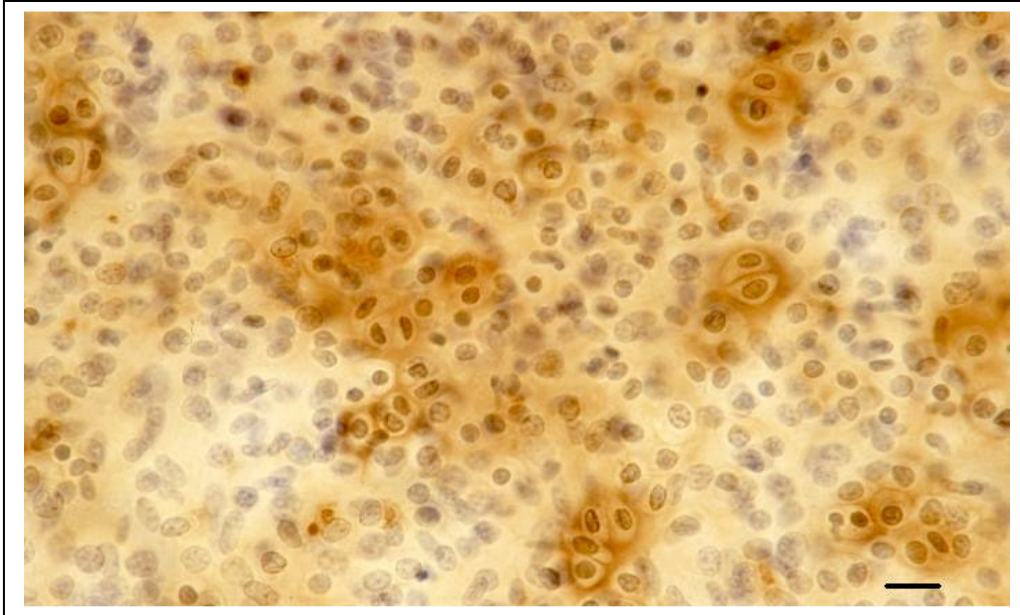


Abbildung 13 **Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ II in der Monokultur:** Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Peripheres Blickfeld bei einer Vergrößerung von 2,5 x 40, Maßstab = 125 μ m

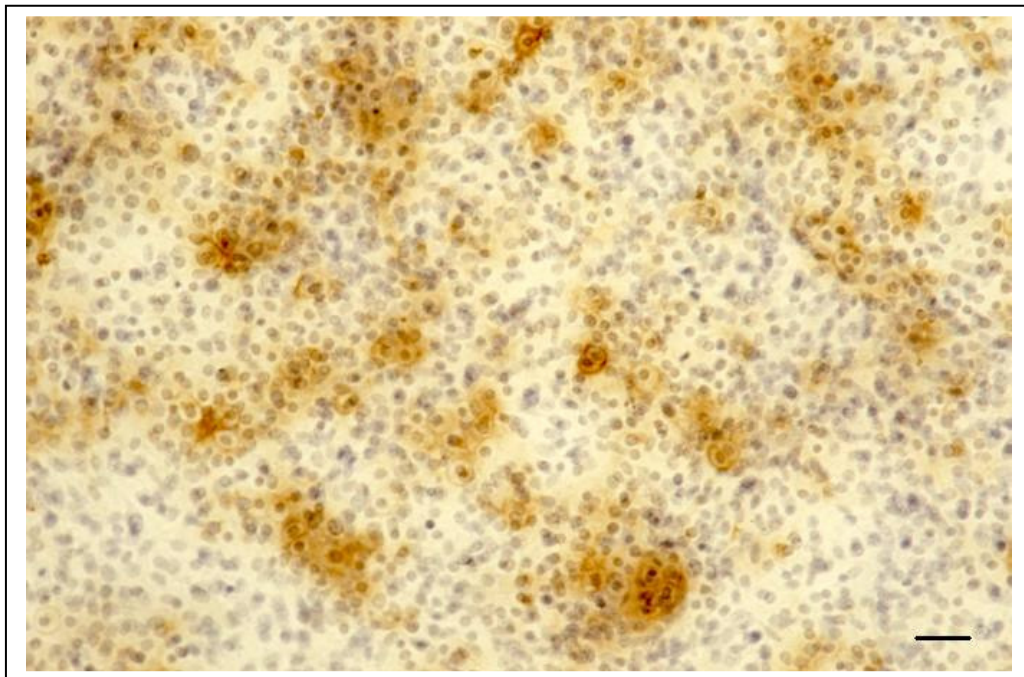


Abbildung 14 **Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ II in der Kokultur.** Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Zentrales Blickfeld bei Vergrößerung von 2,5 x 20, Maßstab = 200 μ m

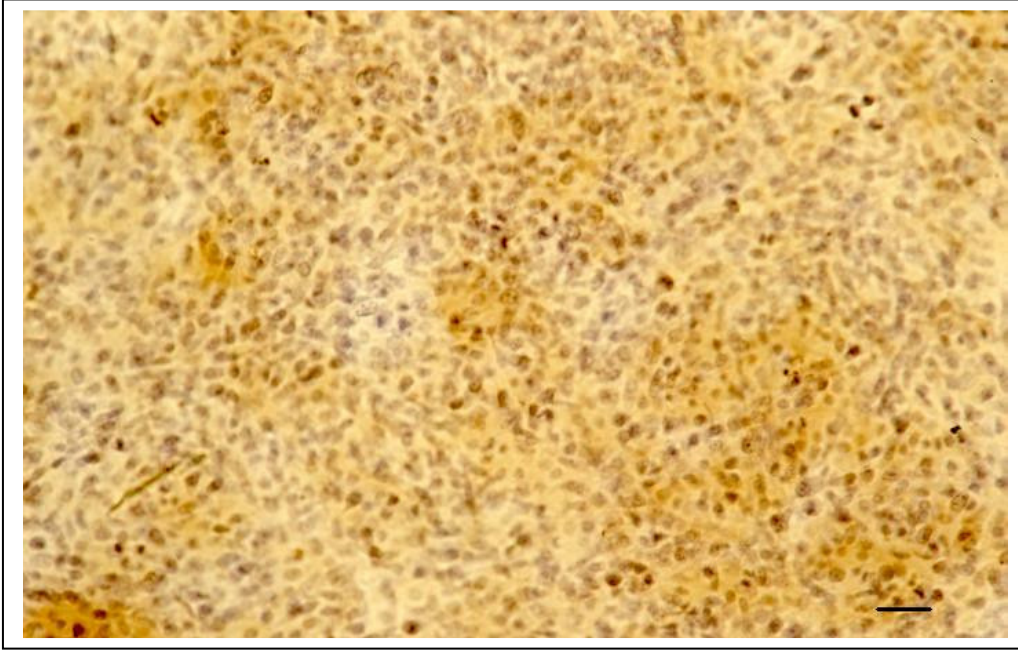


Abbildung 15 **Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ I in der Monokulturen:** Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Zentrales Blickfeld bei einer Vergrößerung von 2,5 x 10, Maßstab = 400 μm

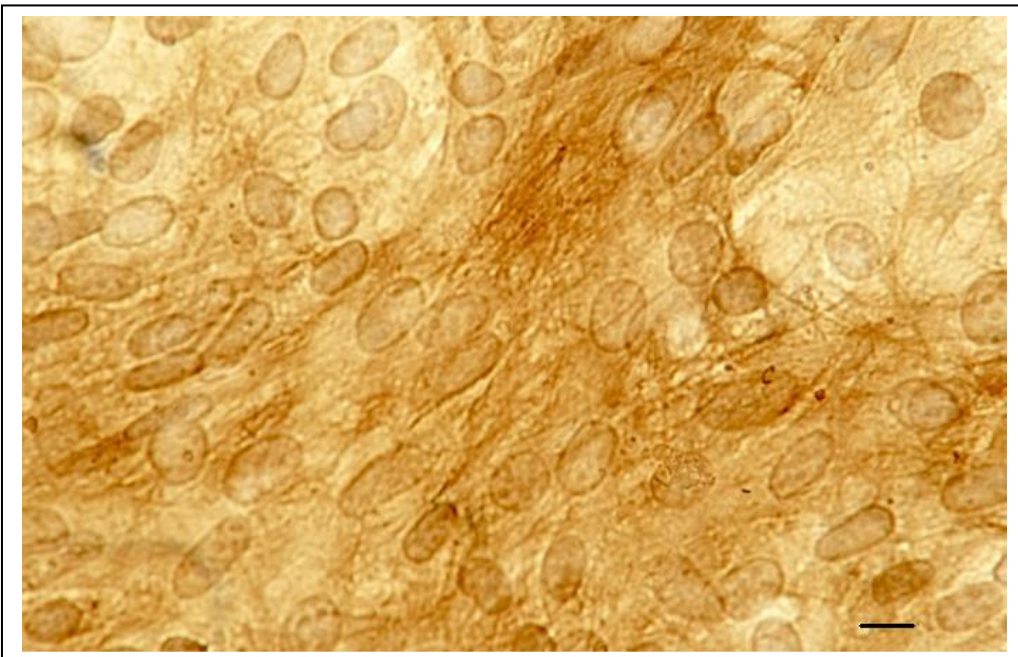


Abbildung 16 **Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ I in Kokulturen:** Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Peripheres Blickfeld bei einer Vergrößerung von 2,5 x 63, Maßstab = 63,5 μm

3.3 Periost

Die Präparation der Periostexplantate erfolgte nach einigen Übungspräparationen sicher, so daß die entscheidenden anatomischen Strukturen bewahrt wurden. Für die Versuchsdurchführung mußten Periostexplantate mit einem Durchmesser von 10 mm gewonnen werden, welches durch die Spezialstanze gewährleistet wurde (s. 2.2.1).

3.3.1 Lichtmikroskopie

Die Periostexplantate zeigten lichtmikroskopisch (25-fache Vergrößerung) die typische zweigeteilte Bindegewebsschicht. Die äußere Schicht, das Stratum fibrosum, hatte einen sehr hohen Fasergehalt, die innere Schicht, das Stratum osteogenicum (Kambiumschicht), erschien aufgrund des Zell-, Nerven- und Gefäßreichtums aufgelockerter. Über die gesamte Kultivierungszeit blieb die Struktur der Periostexplantate erhalten (Abbildung 17).

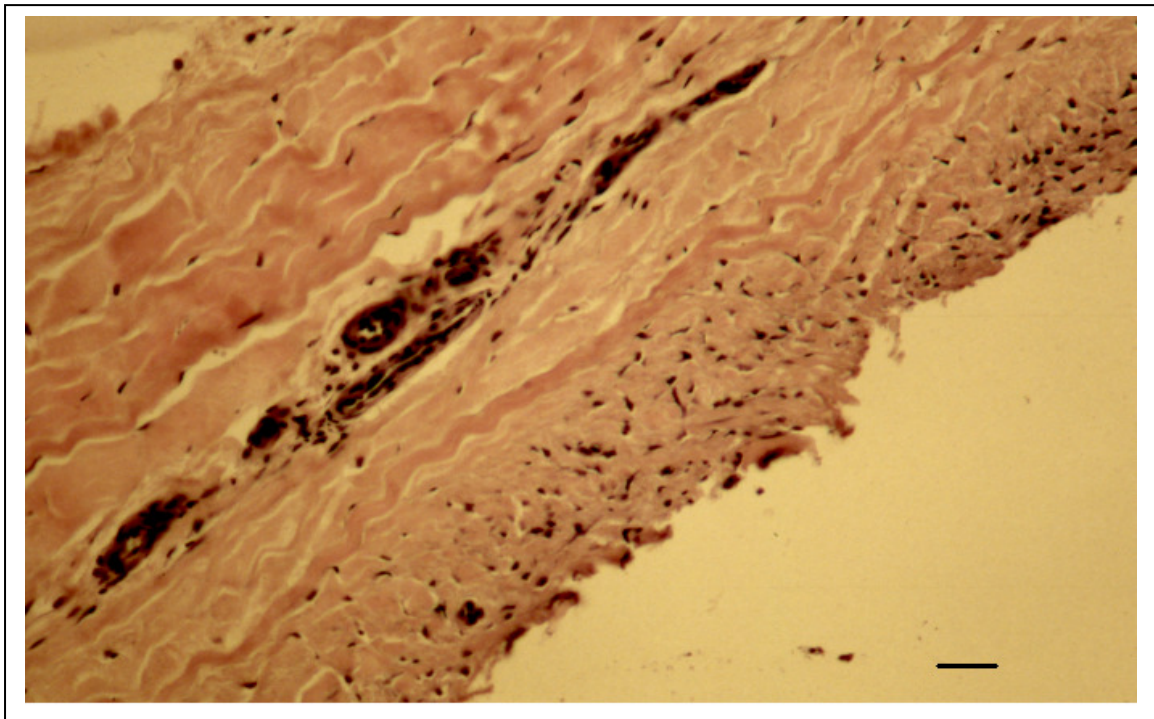


Abbildung 17

Lichtmikroskopische Aufnahme eines Periostexplantates

Zur Darstellung kommt die typische zweigeteilte Bindegewebsschicht, das äußere Stratum fibrosum und das innere Stratum osteogenicum. Vergrößerung 2,5 x 10, Maßstab = 400 µm (H.E.-Färbung)

3.3.2 Rot-Grün-Vitalitätstest

Der Rot-Grün-Vitalitätstest (s. 2.2.3) diente zur Beurteilung der Vitalität der Periostexplantate.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop färbten sich sowohl die Ausgangsprobe des Periosts als auch die entsprechende Probe am Ende der Versuchsreihe überwiegend grün an. Dieses bewies die Unversehrtheit der Zytoplasmamembranen der Periostexplantate und somit, daß ein vitales Gewebeexplantat über die gesamte Inkubationsdauer vorlag. Nur die Schnittränder des auf die exakte Größe präparierten Explantats färbten sich rot, welches den Nachweis auf nichtintakte Zytoplasmamembranen erbrachte.

3.4 DNA-Quantifizierung bei der Mono- und Kokultur

Mit Hilfe der Bestimmung der Gesamtdesoxyribonukleinsäure (DNA) (s. 2.4.1) kann das Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Mono- und Kokulturbedingungen bestimmt werden (Abbildung 18).

Sowohl in der Gruppe S (stationäre Bedingungen), in der Gruppe M (Monokultur) als auch in der Gruppe K (Kokultur) blieb die DNA-Synthese der Chondrozyten in den ersten fünf Tagen gering. Unter Perfusionsbedingungen wiesen die Mono- und die Kokultur (Gruppe M und K) bis zum achten Tag eine höhere Wachstumsrate auf als die Gruppe S. Die Wachstumsrate flachte unter allen drei Kulturbedingungen ab dem 8. Tag bis zum Ende der Kultivierungsdauer am 12. Tag ab.

Das Wachstums- und Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Perfusionsbedingungen in der Gruppe M und K war nach 12 Tagen nahezu identisch. Im Vergleich dazu zeigte sich in der Gruppe S am 12. Tag ein um 35 % geringeres Wachstums- und Proliferationsverhalten der Chondrozyten.

Dieses Wachstums- und Proliferationsverhalten der Chondrozyten korrelierte mit dem lichtmikroskopischen Erscheinungsbild.

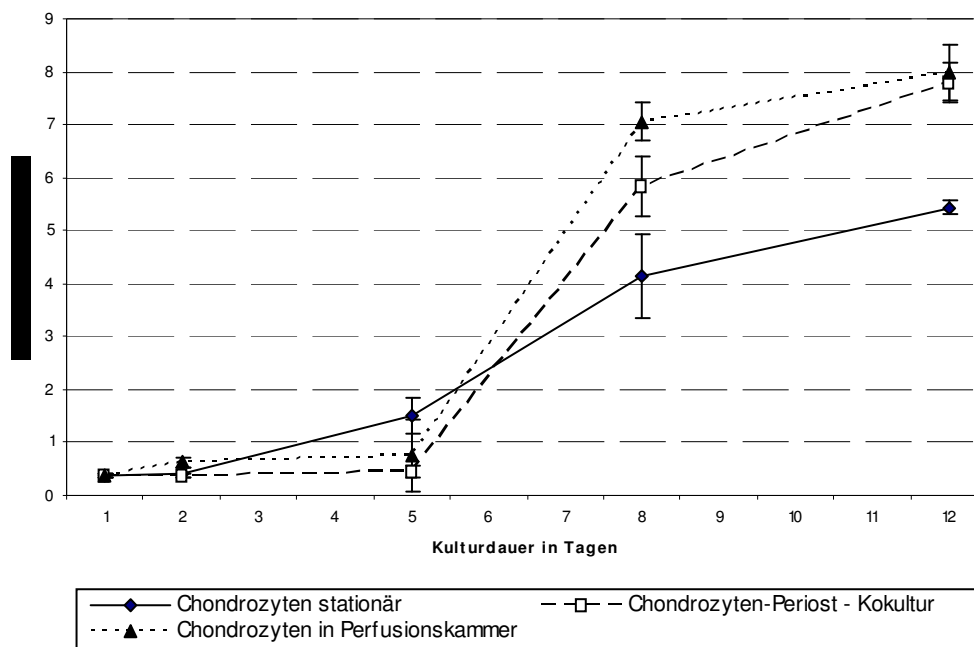


Abbildung 18 Proliferationsverhalten von Chondrozyten unter stationären und Perfusionsbedingungen in der Mono- und Kokultur (n=5)

3.5 Produktion der extrazellulären Matrix in der Mono- und Kokultur

3.5.1 Messung der Proteoglykansynthese mit Hilfe des Sulfateinbaus und des DMB-Assay

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Sulfat ($^{35}\text{[SO]}_4^2$) kann die Syntheseleistung der Chondrozyten von Proteoglykanen in den Gruppen M und K gemessen werden.

Nach einer Inkubationsdauer von 10 Tagen war die Menge des im extrazellulären Raum inkorporierten Sulfates ($^{35}\text{[SO]}_4^2$) in der Gruppe K im Vergleich zur Gruppe M um ca. 15% geringer (Abbildung 19).

Der DMB-Assay misst die Glykosaminoglykansynthese der Chondrozyten. Korrelierend mit dem Ergebnis des Sulfateinbaus überstieg die Matrixproduktion der Chondrozyten in der Monokultur die der Kokultur um ca. 35% nach gleicher Inkubationszeit (Abbildung 20).

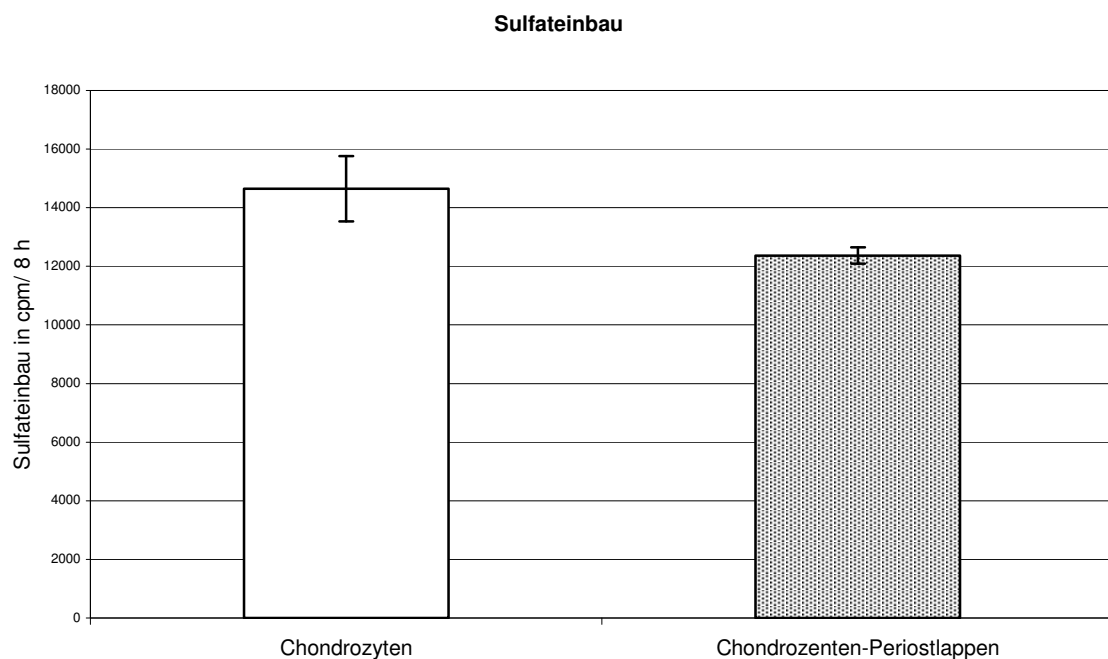


Abbildung 19 Messung der Proteoglykansynthese mit Hilfe von radioaktiv markiertem Sulfat ($^{35}\text{[SO]}_4^2$) (n=5)

Glykosaminoglykan (GAG)-Synthese

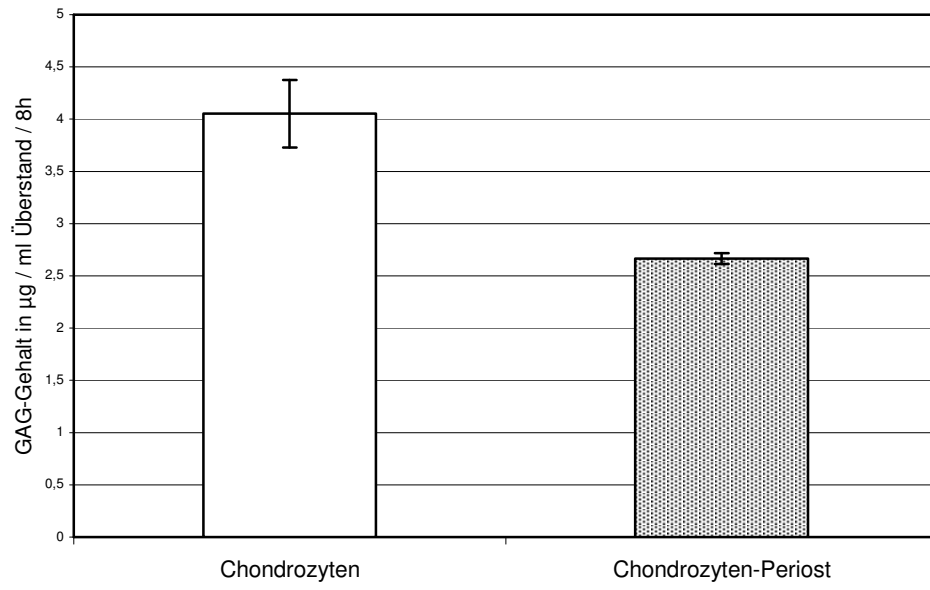


Abbildung 20 Messung der Glykosaminoglykansynthese mit Hilfe des DMB-Assay (n=5)

3.6 Messung der Proteinbiosynthese der Chondrozyten in der Mono- und Kokultur

Anhand der Einbaurrate von radioaktiv markiertem Prolin ($^3\text{[H]}$ -Prolin) konnte das Ausmaß der Proteinbiosynthese abgeschätzt werden.

Nach 10 Tagen fiel unter Einfluss von Periost die Inkorporation von $^3\text{[H]}$ -Prolin um ca. 25% geringer aus als in der Monokultur (Abbildung 21).

Dieses Ergebnis korreliert mit der Messung der Glykosaminoglykansynthese.

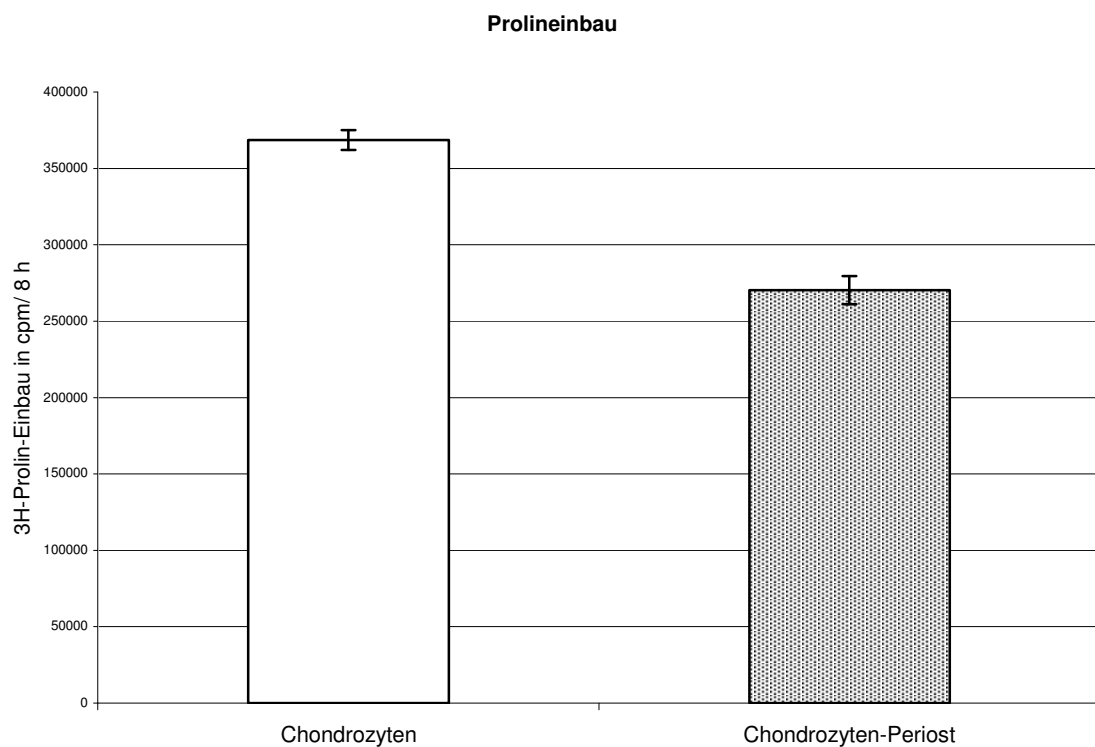


Abbildung 21 **Proteinbiosynthese: Messung der Inkorporation von Prolin (n=5)**

3.7 Quantifizierung von Kollagen Typ II in der Mono- und Kokultur mit Hilfe des ELISA

Mit Hilfe des ELISA wird der Gehalt an extrazellulärem Kollagen Typ II gemessen. Dabei zeigt sich nach zehn Kultivierungstagen eine um 50% reduzierte Menge an Kollagen Typ II in der Extrazellulärmatrix in der Kokultur (Abbildung 22).

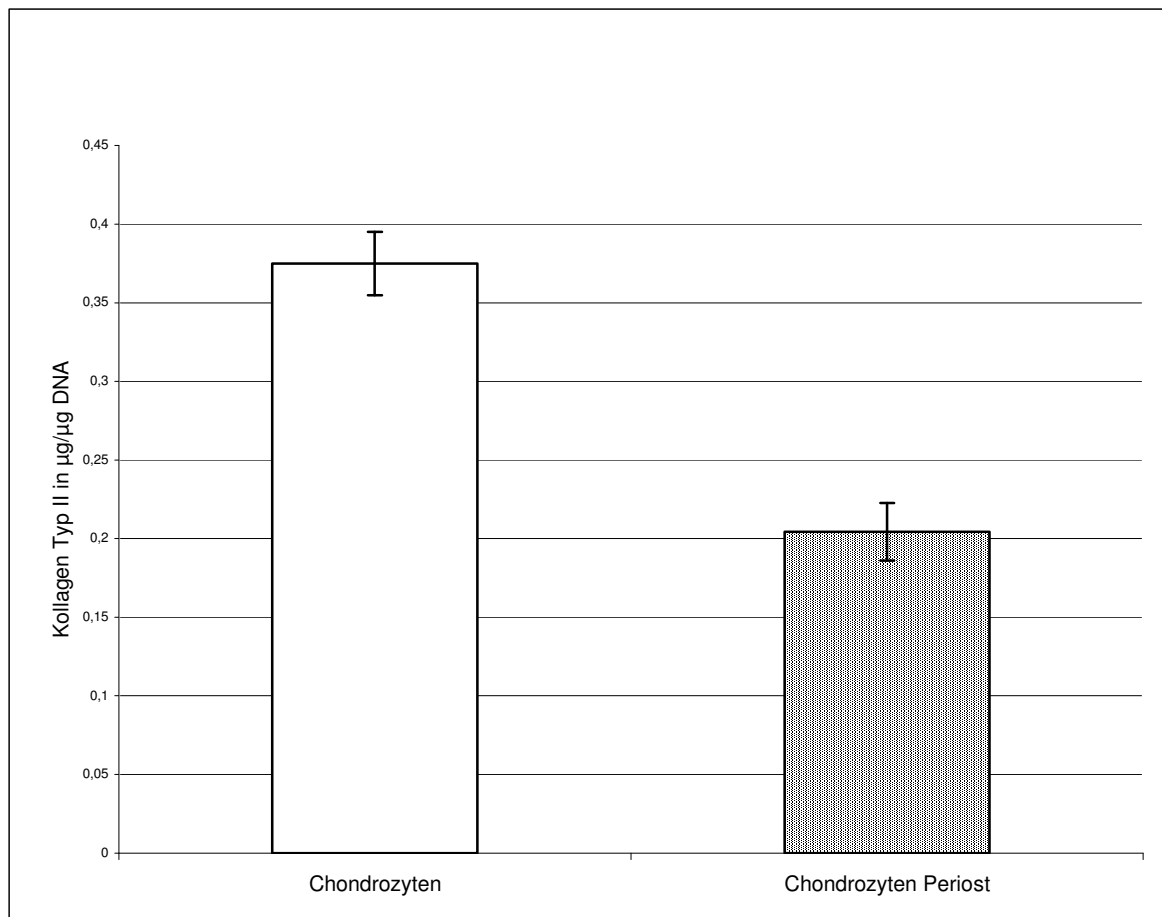


Abbildung 22 Mittels ELISA gemessener Gehalt an Kollagen Typ II in der extrazellulären Matrix (n= 5)

4 Diskussion

Das sozio-ökonomische Problem von Knorpelschäden führte bereits in den 80'er Jahren zu den ersten Erfahrungen mit der Autologen Chondrozyten Transplantation (Peterson, Menche et al. 1984). Mittlerweile stellt diese häufig genutzte Technik eine Behandlung mit guten Langzeitergebnissen dar (Clar, Cummins et al. 2005). Bekannt ist, daß das Periost sowohl entscheidende biochemische als auch biomechanische Eigenschaften besitzt. Jedoch ist bislang ungeklärt, ob das Periost eine rein bedeckende Funktion des lokalen Knorpeldefektes, eine stimulierende Wirkung auf die Chondrozytensuspension oder einen Einfluss auf die Chondrogenese von Seiten der Kambiumschicht hat (Brittberg, Lindahl et al. 1994). Gegen diese Technik sprechen die inadäquate Fixierung der Periostexplantate und die Periosthyperplasie, weshalb mittlerweile Techniken existieren, bei denen der Periostlappen durch resorbierbare Membranen ersetzt wird (Bentley und Greer 1971; Bentley, Biant et al. 2003; Bartlett, Skinner et al. 2005; Gooding, Bartlett et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollten Teilaspekte der Wechselwirkung zwischen Periostlappen und isolierten Chondrozyten untersucht werden. Eine Übertragung der in vivo Situation auf ein in vitro Modell ist nur eingeschränkt möglich, zumal die bei der ACT zum Tragen kommenden Milieubedingungen bisher nur unzureichend bekannt sind (Fang und Hall 1997).

4.1 Das in vitro Perfusionssystem

Um den Einfluss verschiedener Zellpopulationen möglichst den in vivo Bedingungen simulierend zu untersuchen, eignet sich die Kultivierung. Bei der Zellkultivierung wird Knorpelgewebe dissoziiert und in Kulturschalen als adhärente Einzellschicht unter Monokulturbedingungen kultiviert. In der vorliegenden Arbeit sollte der direkte Einfluss von Periostlappenexplantaten auf isolierte Chondrozyten untersucht werden. Kokulturen zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen oder Geweben sind vielfach publiziert (Kurz und Schunke 1997; Kurz, Steinhagen et al. 1999; Dreier, Wallace et al. 2001), stellen aber eine besondere Herausforderung dar. Bei stationären Kulturen sind artifizielle Ergebnisse allein aufgrund von pH-Verschiebungen und unterschiedlichem Substratverbrauch zwischen Mono- und Kokultur möglich (Sittinger, Bujia et al. 1996). Perfusionskammern können die genannten störenden Einflüsse reduzieren (Minuth, Schumacher et al. 2000).

So erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Kokultivierung unter Zuhilfenahme eines herkömmlichen Perfusionskammersystems, bei dem zwei Perfusionskammern in Reihe geschaltet, miteinander verbunden wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter stationären Kulturbedingungen zu einem Abfall des pH-Wertes von 7,45 auf 7,09 kam, unter Perfusionsbedingungen ein annähernd gleichbleibender pH-Wert von 7,42 bzw. 7,38 beibehalten werden konnte.

Weiterhin konnte mit dieser Versuchsanordnung ein unidirektionaler Nährstofffluss garantiert werden, um den Einfluss von Periostexplantaten auf isolierte bovine Chondrozyten zu untersuchen.

Das Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Perfusionsbedingungen wurde nachweislich durch gleich bleibende pH-Werte positiv beeinflusst, so daß am Ende der Inkubationszeit ein deutlich höherer DNA-Gehalt als unter stationären Bedingungen gemessen werden konnte.

4.2 Periost unter Kulturbedingungen

Periostexplantate wurden aus den Metatarsalgelenken von adulten Rindern gewonnen. Die Präparation erfolgte mit akribischer Vorsicht, da das chondrogene Potential an die intakte Kambiumschicht gebunden ist (O'Driscoll und Fitzsimmons 2000). Durch die Mikroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit die intakte Kambiumschicht nachgewiesen und eine Periosthyperplasie ausgeschlossen werden. Der Vitalitätstest zeigte, daß es sich bei den Periostexplantaten um vitales Gewebe handelte.

4.3 Chondrozyten in der Monokultur und in der Kokultur mit Periostexplantaten

Morphologisch zeigten sich die Chondrozyten in den ersten vier bis fünf Tagen als polygonale Zellen, die sich durch rege Zellteilungen zu einem konfluenten Monolayer entwickelten. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahmen diese dann eine fibroblastäre Zellform an.

Sowohl in der Monokultur als auch in der Kokultur trat diese histologische Veränderung auf. Dieses Dedifferenzierungsverhalten der Chondrozyten ist für Kulturen unter Monolayerbedingungen beschrieben worden (Chako, Abbott et al. 1969; Levitt und

Dorfman 1974). Die Ursachen des Dedifferenzierungsprozesses werden unterschiedlich erklärt. Sokoloff vermutete als Ursache das Vorhandensein von unreifen Chondroblasten, die die Kultur überwachsen (Sokoloff 1976), andere Autoren hingegen sahen die Veränderungen als einen Alterungsprozess an (Schiltz, Mayne et al. 1973; Grundmann, Zimmermann et al. 1980). Grundmann und Zimmermann beschrieben, dass der hyaline Knorpel bereits in vivo über unterschiedliche Zellpopulationen verfügt und begründeten die Dedifferenzierung als Kombination aus primär vorhandenen fibroblastenartigen Zellen und alternden Chondrozyten (Grundmann, Zimmermann et al. 1980). Neben den morphologischen Veränderungen für die Dedifferenzierung vom rund-polygonalen zum bipolaren Typ werden von einigen Autoren übereinstimmend als Dedifferenzierungsindikator der Wechsel der Kollagen-Synthese von Typ II zu Typ I genannt (von der Mark und Conrad 1979; Elima und Vuorio 1989; von der Mark, Kirsch et al. 1992; Benya und Padilla 1977; von der Mark, Gauss et al. 1977; Haudenschild, McPherson et al. 2001). Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die monokultivierten Chondrozyten immunzytochemisch stärker auf Kollagen Typ II und nur schwach auf Kollagen Typ I anfärbbar waren. Dieses Ergebnis impliziert, dass Chondrozyten in der Monokultur länger differenziert verbleiben, wohingegen mit Periost kokultivierte Chondrozyten dedifferenzieren, welches immunzytochemisch in der schwachen Anfärbbarkeit für Kollagen Typ II, jedoch starken Ausprägung für Kollagen Typ I ersichtlich war.

Die vorliegende Untersuchung legt den Schluss nahe, dass Periost einen dedifferenzierenden Effekt auf isolierte Chondrozyten in vitro hat.

4.4 Einfluss von Periost auf die von Chondrozyten gebildete Extrazellulärmatrix

Chondrozyten besitzen die Fähigkeit zur Sekretion wichtiger Matrixmoleküle, wie Proteoglykane und Kollagen Typ II. Durch einen aktiven Metabolismus steuern Chondrozyten den Auf- und Abbau ihrer extrazellulären Matrix (Poole, Kojima et al. 2001).

Der bereits morphologisch erkennbare Wechsel zu dedifferenzierten Chondrozyten konnte auch qualitativ in der Immunzytochemie (Wechsel von Kollagen Typ II zu Kollagen Typ I) gezeigt werden. Einschränkend ist aber darauf hinzuweisen, dass eine semiquantitative

Bewertung der Immunzytochemie in der gewählten Form nicht möglich ist. Hingegen konnte mit dem ELISA eine quantitative Analyse durchgeführt werden. Hierbei führte die Kokultivierung mit Periostexplantaten zu einer um 50% reduzierten Ausprägung an Kollagen Typ II in der extrazellulären Matrix. Ursächlich hierfür können zwei unterschiedliche Mechanismen sein. Zum einen kann eine verringerte Proteinbiosynthese zur Reduktion der Extrazellulärmatrix führen, welches die um 25% geringere Einbaurrate von ³H-Prolin zeigte. Dieses Ergebnis korreliert mit Ergebnissen, bei denen die ³H-Prolin-Einbaurrate in Kollagenproteine durch Zytokine, die aus Synovialzellen freigesetzt werden, inhibiert wird (Evans, Georgescu et al. 1987). Jedoch ist bislang nicht bekannt, welche Faktoren verantwortlich sind, die die Proteinbiosynthese von mit Periostexplantaten kokultivierter Chondrozyten herabsetzt. Inhibitorisch wirksam ist insulinelike growth factor-1 (IGF-1), ein wichtiger Faktor, der die Homöostase zwischen Matrixsynthese und Matrixdegeneration kontrolliert. Ein reduzierter IGF-1 führt zu einer verminderten Expression der extrazellulären Matrix (Schalkwijk, Joosten et al. 1989). Ebenfalls einen katabolen Effekt auf die Proteinbiosynthese besitzt Interleukin-1 (Reddi 1998; van den Berg und Bresnihan 1999). Diese Wachstumsfaktoren haben ihren Ursprung in den Chondrozyten, der Gelenkflüssigkeit, der umgebenen Synovialis und Periost (van den Berg, van der Kraan et al. 2001).

Zum anderen demonstriert die um 15% verminderte Inkorporation von radioaktiv markiertem Sulfat in Proteoglykane einen vermehrten Abbau der Extrazellulärmatrix. Dieses kann durch die korrelierende Dimethyl-Blau-Assay-Messung, die um 35% geringer ausfiel, bestätigt werden. Ursächlich für die reduzierte Ausprägung der extrazellulären Matrix kann in einem vermehrten Abbau des Kollagens durch proteolytische Enzyme liegen. In vitro Versuche haben gezeigt, dass Periost die Kollagenase, Matrix-Metalloproteinase (MMP-1), synthetisiert, welche in einer inaktiven Form in der extrazellulären Matrix des Periosts gespeichert wird (van der Zee, Everts et al. 1993; van der Zee, Everts et al. 1994; van der Zee, Everts et al. 1996). Diese inaktive Form der Matrix-Metalloproteinase wird durch Zytokine, insbesondere durch Interleukin-1(IL-1) und Transforming Growth Faktor beta (TGF-beta), beeinflusst. Interleukin-1 beschleunigt die extrazelluläre Digestion, indem es die Kollagenaseausschüttung aus dem Periost steigert, wohingegen Transforming Growth Faktor beta dem Interleukin-1 eine gegengerichtete Wirkung ausübt (van der Zee 1997). Diese Beobachtung könnte ein Indiz für die reduzierte Kollagen Typ II Deposition in der Kokultur sein.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kokultivierung von Periostlappen auf isolierte Chondrozyten zu einer Veränderung der Proliferation, Differenzierung und Extrazellulärmatrixproduktion führt. In dem gewählten Versuchsaufbau zeigt Periost einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation und extrazelluläre Deposition von Kollagen Typ II im Sinne der Synthese und Ausprägung. Bisher wurde für Periostexplantate postuliert, daß diese neben reinen Defekt bedeckenden Eigenschaften bei der ACT einen positiv stimulierenden Effekt auf den Extrazellulärmetabolismus haben. Anhand der vorliegenden Arbeit kann die Tendenz, dass das Periost durch synthetische Membranen ersetzt wird, nicht widerlegt werden. Eine unmittelbare Übertragung der gewonnenen Daten auf die in vivo Situation bei der Autologen Chondrozytentransplantation ist nicht möglich. Zu erwähnen sind hierbei die verschiedenen Spezies (Rind/Mensch) und die Einschränkungen des Versuchsaufbaus. Umgekehrt ergeben sich aber aufgrund der gewonnenen Ergebnisse Zweifel, ob der Periostlappen bei der ACT tatsächlich die postulierte biologisch aktive Rolle spielt. Die vorliegende Arbeit bietet die Grundlage für weitergehende Untersuchungen, über welche mögliche Signalkaskade Periost auf Chondrozyten bei der autologen Chondrozytentransplantation wirkt.

5 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Periostlappentransplantaten bei der Behandlung von Gelenkknorpeldefekten mit autologen Chondrozytensuspensionen ist umstritten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Periostexplantaten auf das Wachstum und die Matrixsynthese von isolierten Chondrozyten in einem Perfusionskokultursystem *in vitro* zu untersuchen.

Bovine Chondrozyten und bovine Periostexplantate wurden in einem neu entwickelten Kokultursystem gemeinsam kultiviert. Der Einsatz von Perfusionskammern sorgte für gleichbleibende Kulturbedingungen im Hinblick auf die Nährstoffzufuhr und den Abtransport von Stoffwechselprodukten bei gleichzeitig konstantem pH-Wert.

In dem neu etablierten Perfusionskammermodell proliferierten Chondrozyten unter dem Einfluss von Periostlappen langsamer. Die histologischen und immunzytochemischen Untersuchungen konnten zeigen, dass Chondrozyten *in vitro* unter dem Einfluss von Periostlappenexplantaten schneller dedifferenzieren und eine deutlich geringere Deposition von extrazellulärem Kollagen Typ II zeigten.

Zu den wesentlichen Komponenten der extrazellulären Matrix von hyalinem Knorpel gehören die Proteoglykane und das Kollagen Typ II. Unter dem Einfluss von Periostlappenexplantaten konnten eine Reduktion der biosynthetischen Aktivität (Prolineinbau) und eine Verminderung der Einbauraten radioaktiv markierten Sulfats (Proteoglykane) nachgewiesen werden. Kokultivierte Chondrozyten zeigten bei der ELISA-Messung eine reduzierte Synthese von knorpelspezifischem Kollagen Typ II und wiesen eine verminderte Syntheserate für Glykosaminoglykane auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen katabolen Effekt der Periostexplantate auf isolierte Chondrozyten *in vitro*. Das Periost wirkt dedifferenzierend auf den Phänotyp der Chondrozyten und führt zu einer Reduktion von funktionell bedeutsamen Kollagen und Proteoglykanen. Die Ergebnisse der Arbeit stützen den gegenwärtigen klinischen Trend, bei der autologen Chondrozytentransplantation synthetische Membranen an Stelle der Periostlappenexplantate zu verwenden.

6 Literaturverzeichnis

- Agneskirchner, J., P. Brucker, et al. (2001). "Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS)." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, online-Publikation: DOI 10. 1007.
- Bartlett, W., J. A. Skinner, et al. (2005). "Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study." J Bone Joint Surg Br **87**(5): 640-5.
- Basset, C. A. L. (1962). "Current concepts of bone formation." J. Bone Joint Surg. **44A**: 1217.
- Bentley, G., L. C. Biant, et al. (2003). "A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee." J Bone Joint Surg Br **85**(2): 223-30.
- Bentley, G. und R. B. Greer, 3rd (1971). "Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits." Nature **230**(5293): 385-8.
- Benya, P. D. und S. R. Padilla (1977). "The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I, III and type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogen bromide peptide analysis." Biochem(16): 865-872.
- Bobic, V. (1999). "[Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions]." Orthopade **28**(1): 19-25.
- Bouwmeester, P. S., R. Kuijer, et al. (2002). "A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years follow-up." J Orthop Res(20): 267-273.
- Brittberg, M., A. Lindahl, et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med **331**(14): 889-95.
- Brittberg, M., T. Tallheden, et al. (2001). "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update." Clin Orthop(391 Suppl): S337-48.
- Bruns, J. und J. Steinhagen (1999). "[Transplantation of chondrogenic tissue in the treatment of lesions of the articular cartilage]." Orthopade **28**(1): 52-60.
- Buckwalter, J. A. und H. J. Mankin (1997). "Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions." J Bone Joint Surg Am **79**(600-611).
- Buckwalter, J. A. und H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage repair and transplantation." Arthritis Rheum **41**(8): 1331-42.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.
- Chako, S., J. Abbott, et al. (1969). "The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behaviour of the progeny of a single chondrocyte." J Exp Med(130): 417-441.
- Chesterman, P. J. und A. U. Smith (1968). "Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits." J Bone Joint Surg Br **50**(1): 184-97.
- Clar, C., E. Cummins, et al. (2005). "Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation." Health Technol Assess **9**(47): iii-iv, ix-x, 1-82.
- Convery, F. R., W. H. Akeson, et al. (1972). "The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses." Clin Orthop **82**: 253-62.
- Curl, W., J. Krome, et al. (1997). "Cartilage injuries: A review of 31.516 knee arthroscopies." Arthroscopy(13): 456-460.
- Dreier, R., S. Wallace, et al. (2001). "Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9)." J Cell Sci **114**(Pt 21): 3813-22.
- Elima, K. und E. Vuorio (1989). "Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture." FEBS Lett **258**(2): 195-8.
- Evans, C. H., H. I. Georgescu, et al. (1987). "Modulation of chondrocyte metabolism by cytokines produced by a synovial cell line." Development and disease of cartilage and bone matrix(Alan R. Liss, Inc.): 319-329.
- Fang, J. und B. K. Hall (1997). "Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteal." Anat Embryol (Berl) **196**(5): 349-62.

- Farndale, R. W., C. A. Sayers, et al. (1982). "A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures." Connect Tissue Res **9**(4): 247-8.
- Garrett, J. C. (1986). "Treatment of osteochondral defects of the distal femur with fresh osteochondral allografts: a preliminary report." Arthroscopy **2**(4): 222-6.
- Gelber, A., M. Hochberg, et al. (2000). "Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis." Ann Intern Med(133): 321-328.
- Gooding, C. R., W. Bartlett, et al. (2006). "A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered." Knee **13**(3): 203-10.
- Goymann, V. (1999). "[Abrasion arthroplasty]." Orthopade **28**(1): 11-8.
- Grundmann, K., B. Zimmermann, et al. (1980). "Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies." Virchows Arch A Pathol Anat Histol **389**(2): 167-87.
- Ham, A. (1930). "A histological study of the early phase of bone repair." J Bone Joint Surg Am(12): 827.
- Hangody, L., G. Kish, et al. (1997). "Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects." Orthop Intern **5**: 175-181.
- Haudenschild, D. R., J. M. McPherson, et al. (2001). "Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation." Anat Rec **263**(1): 91-8.
- Helbing, G. und C. Burri (1984). "[Cartilage lesions]." Helv Chir Acta **51**(5): 563-74.
- Homminga, G. N., S. K. Bulstra, et al. (1990). "Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee." J Bone Joint Surg Br **72**(6): 1003-7.
- Hopkinson, W. J., W. A. Mitchell, et al. (1985). "Chondral fractures of the knee. Cause for confusion." Am J Sports Med **13**(5): 309-12.
- Huntziker, E. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis Cartilage(10): 432-463.
- Imhoff, A. B., G. M. Ottl, et al. (1999). "[Autologous osteochondral transplantation on various joints]." Orthopade **28**(1): 33-44.
- Ito, Y., J. S. Fitzsimmons, et al. (2001). "Localization of chondrocyte precursors in periosteum." Osteoarthritis Cartilage **9**(3): 215-23.
- Johnson, L. (1991). "Arthroscopic abrasion arthroplasty." In: McGinty JB, ed.: Operative Arthroscopy New York: Raven Press(319-323).
- Junqueira, L. C. und J. Carneiro (1996). Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histopathologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 151-202.
- Karsten, U. und A. Wollenberger (1977). "Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates." Anal Biochem **77**(2): 464-70.
- Kurz, B. und M. Schunke (1997). "Articular chondrocytes and synoviocytes in culture: influence of antioxidants on lipid peroxidation and proliferation." Ann Anat **179**(5): 439-46.
- Kurz, B., J. Steinhagen, et al. (1999). "Articular chondrocytes and synoviocytes in a co-culture system: influence on reactive oxygen species-induced cytotoxicity and lipid peroxidation." Cell Tissue Res **296**(3): 555-63.
- Laprell, H. und W. Petersen (2001). "Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS): 6 to 12 years follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint." Arch Orthop Trauma Surg(121): 248-253.
- Levitt, D. und A. Dorfman (1974). "Concepts and mechanisms of cartilage differentiation." Curr Top Dev Biol **8**: 103-49.
- Lohmander, S. (1988). "Proteoglycans of joint cartilage: Structure, function, turnover and role as markers of joint disease." Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol **2**: 37-57.
- Mankin, H. J. (1982). "The response of articular cartilage to mechanical injury." J Bone Joint Surg Am **64**(3): 460-6.
- Messner, K. und W. Maletius (1996). "The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes." Acta Orthop Scand **67**(2): 165-8.
- Minuth, W. W., K. Schumacher, et al. (2000). "Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering." J Biomater Sci Polym Ed **11**(5): 495-522.
- Muller, B. und D. Kohn (1999). "[Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Priddle method]." Orthopade **28**(1): 4-10.

- O'Driscoll, S. W. und J. S. Fitzsimmons (2000). "The importance of procedure specific training in harvesting periosteum for chondrogenesis." Clin Orthop(380): 269-78.
- O'Driscoll, S. W. und J. S. Fitzsimmons (2001). "The role of periosteum in cartilage repair." Clin Orthop(391 Suppl): S190-207.
- O'Driscoll, S. W., F. W. Keeley, et al. (1988). "Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year." J Bone Joint Surg Am **70**(4): 595-606.
- O'Driscoll, S. W., A. D. Recklies, et al. (1994). "Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in vitro study." J Bone Joint Surg Am **76**(7): 1042-51.
- O'Driscoll, S. W., D. B. Saris, et al. (2001). "The chondrogenic potential of periosteum decreases with age." J Orthop Res **19**(1): 95-103.
- Otte, P. (2001). "Der Arthrose-Prozeß. Teil 1: Osteochondrale Strukturen." Nürnberg: Novartis Pharma Verlag: 13-66.
- Peterson, L. (1996). "Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee." Acta Orthop Belg **62 Suppl 1**: 196-200.
- Peterson, L., D. Menche, et al. (1984). "Chondrocyte transplantation: An experimental model in the rabbit." Trans Orthop Res Soc(9): 218.
- Poole, A. R., T. Kojima, et al. (2001). "Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair." Clin Orthop(391 Suppl): S26-33.
- Pridie, K. (1959). "A method of resurfacing osteoarthritic knee joints." J Bone Joint Surg Am(41): 618-619.
- Reddi, A. H. (1998). "Cartilage-derived morphogenetic proteins and cartilage morphogenesis." Microsc Res Tech **43**(2): 131-6.
- Rubak, J. M., M. Poussa, et al. (1982). "Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits." Acta Orthop Scand **53**(2): 181-6.
- Sahlstrom, A., O. Johnell, et al. (1997). "The natural course of arthrosis of the knee." Clin Orthop(340): 152-7.
- Schalkwijk, J., L. A. Joosten, et al. (1989). "Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid." Arthritis Rheum **32**(1): 66-71.
- Schiltz, J. R., R. Mayne, et al. (1973). "The synthesis of collagen and glycosaminoglycans by differentiated chondroblasts in culture." Cell Diff(1): 97-108.
- Scully, S. P., J. W. Lee, et al. (2001). "The role of the extracellular matrix in the articular chondrocyte regulation." Clin Orthop(391S): S72-S89.
- Sellards, R. A., S. J. Nho, et al. (2002). "Chondral injuries." Curr Opin Rheumatol **14**(2): 134-41.
- Shapiro, F., S. Koide, et al. (1993). "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **75**(4): 532-53.
- Sittinger, M., J. Bujia, et al. (1996). "Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques." Biomaterials **17**(3): 237-42.
- Sokoloff, L. (1976). "Articular chondrocytes in culture: matrix production and hormonal effects." Arthritis Rheum **19 Suppl 3**: 426-9.
- Steadman, J. R., W. G. Rodkey, et al. (1999). "[The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]." Orthopade **28**(1): 26-32.
- Stockwell, R. und G. Meachin (1979). "The chondrocytes." In Freeman MAR (ed). Adult Articular Cartilage. Turnbridge Wells, United Kingdom, Pitman Medical Ed 2.: 69-144.
- Taylor, K. E. und G. M. Jefree (1969). "A new metachromatic dye, 1:9-dimethyl methylene blue." Histochem. J. **1**, 199-204.
- Terato, K. und e. al. (1996). Clin. Immunol. Immunopathol.(79): 142-154.
- van den Berg, W. B. und B. Bresnihan (1999). "Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1." Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol **13**(4): 577-97.
- van den Berg, W. B., P. M. van der Kraan, et al. (2001). "Growth factors and cartilage repair." Clin Orthop(391 Suppl): S244-50.
- van der Zee, E., V. Everts, et al. (1996). "Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation." J Periodontal Res **31**(7): 483-8.
- van der Zee, E., V. Everts, et al. (1993). "Interleukin-1 alpha and epidermal growth factor synergistically enhance the release of collagenase by periosteal connective tissue in vitro." Matrix **13**(5): 389-98.

- van der Zee, E., V. Everts, et al. (1994). "Immunolocalisation of collagenase in rabbit periosteal tissue explants and extraction of the enzyme. The effect of the cytokines IL-1 alpha and EGF." J Cell Sci **107 (Pt 4)**: 1047-53.
- von der Mark, K. und G. Conrad (1979). "Cartilage cell differentiation: review." Clin Orthop(139): 185-205.
- von der Mark, K., V. Gauss, et al. (1977). "Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture." Nature **267**: 531-532.
- von der Mark, K., T. Kirsch, et al. (1992). "Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy." Arthritis Rheum **35**(7): 806-11.
- von Schroeder, H., Y. Miura, et al. (1994). "A comparison of the chondrogenic potentials of periosteum and perichondrium in vitro." Trans Orthop Res Soc(19): 359.
- Wagner, H. (1964). "Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenks." Z Orthopädie: 62 - 64.
- Wildner, M., O. Sangha, et al. (2000). "Wirtschaftlichkeitsuntersuchung zur autologen Chondrozytentransplantation." Arthroskopie **13**: 123 - 131.
- Wirth, C. und M. Rudert (1996). "Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literature." Arthroscopy(12): 300-308.

7 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1	Modell der autologen Chondrozytentransplantation.....	9
Abbildung 2	Medien und Ansätze zur Isolierung und Kultivierung von Chondrozyten .	13
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Ringträger; Ansicht von der Seite und von oben (Originalabbildung Fa. Minucells und Minutissue).....	14
Abbildung 4	Ringträger mit Membran (Originalabbildung Fa. Minucells und Minutissues).....	14
Abbildung 5	Ansätze und Chemikalien zur immunzytochemischen Untersuchung	15
Abbildung 6	Medien und Ansätze zur Isolierung und Kultivierung von Periostexplantaten	17
Abbildung 7	Ansätze und Chemikalien für Färbestammlösung	18
Abbildung 8	Modell des Perfusionskammersystems	20
Abbildung 9	Ansätze und Reagenzien zur quantitativen Analyse der extrazellulären Matrixproduktion über den Sulfateinbau	24
Abbildung 10	Ansätze und Reagenzien zur quantitativen Analyse der extrazellulären Matrixproduktion	26
Abbildung 11	Ansätze und Reagenzien zur quantitativen Analyse der extrazellulären Matrixproduktion über den Prolineinbau.....	27
Abbildung 12	Ansätze und Reagenzien des Kollagen Typ II - ELISA.....	29
Abbildung 13	Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ II in der Monokultur: Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Peripheres Blickfeld bei einer Vergrößerung von 2,5 x 40, Maßstab = 125 µm.....	32
Abbildung 14	Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ II in der Kokultur. Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Zentrales Blickfeld bei Vergrößerung von 2,5 x 20, Maßstab = 200 µm.....	32
Abbildung 15	... Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ I in der Monokulturen: Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Zentrales Blickfeld bei einer Vergrößerung von 2,5 x 10, Maßstab = 400 µm	33
Abbildung 16	Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ I in Kokulturen: Immunzytochemische Darstellung nach 12-tägiger Kulturdauer. Peripheres Blickfeld bei einer Vergrößerung von 2,5 x 63, Maßstab = 63,5 µm.....	33

Abbildung 17	Lichtmikroskopische Aufnahme eines Periostexplantates Zur Darstellung kommt die typische zweigeteilte Bindegewebsschicht, das äußere Stratum fibrosum und das innere Stratum osteogenicum. Vergrößerung 2,5 x 10 , Maßstab = 400 µm (H.E.-Färbung).....	34
Abbildung 18	Proliferationsverhalten von Chondrozyten unter stationären und Perfusionsbedingungen in der Mono- und Kokultur (n=5)	36
Abbildung 19	Messung der Proteoglykansynthese mit Hilfe von radioaktiv markiertem Sulfat ($^{35}\text{[SO]}_4^2$) (n=5)	37
Abbildung 20	Messung der Glykosaminoglykansynthese mit Hilfe des DMB-Assay (n=5)	38
Abbildung 21	Proteinbiosynthese: Messung der Inkorporation von Prolin (n=5)	39
Tabelle 1	Antikörper zur Kollagentypisierung	16
Tabelle 2	pH-Durchschnittswerte nach 10 Tagen unter stationären und Perfusionsbedingungen (n=5)	30

8 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

An erster Stelle sei **Herrn Prof. Dr. Rüter** herzlichst gedankt für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Fragestellung.

Weiterhin möchte ich **Herrn Prof. Dr. Bruns** für die Übernahme der anfänglichen Begleitung meiner Arbeit, insbesondere während der experimentellen Phase und für die konstruktiven Korrekturen danken.

Besonderer Dank geht an **Herrn Dr. Jörn Steinhagen**, durch dessen Idee ich an das Thema meiner Doktorarbeit gekommen bin, dass er mir mit Rat und Tat zur Seite stand und unermüdlich beim Korrekturlesen der Arbeit half.

Der Klinik für Orthopädie der Universitätsklinik Eppendorf danke ich für die großzügige Unterstützung bei der Benutzung der Räumlichkeiten und der Geräte.

Weiterhin verdanke ich die Einarbeitung in das Zellkulturlabor und das Erlernen der experimentellen Fähigkeiten **Frau Mimiko Kujiraoka**.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Frau, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Florian Klebig
Ricarda-Huch-Str. 25
28215 Bremen
Geboren am 11. Oktober 1973 in Elmshorn, Schleswig Holstein

Schulbildung:

1981 - 1984	Birkenallee Grundschule, Uetersen
1984 - 1990	Ludwig-Meyn-Gymnasium, Uetersen
1990 - 1991	West-Iredell High School, Statesville, USA (Diploma)
1991 - 1993	Ludwig-Meyn-Gymnasium, Uetersen (Abitur)

Ausbildung:

1993 - 1995	Bankkaufmann bei der Hamburger Sparkasse, Hamburg
-------------	---

Studium:

1995 - 2002	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1999	Erstes Staatsexamen
2001	Zweites Staatsexamen
2002	Drittes Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeiten:

2002 - 2004	Arzt im Praktikum in der Orthopädie im DIAKO, Ev. Diakonie-Krankenhaus gGmbH, Bremen
2004 - 2005	Orthopädie, DRK – Anstalten Wesermünde Seepark, Langen-Debstedt
2005 - 2006	Orthopädie, DIAKO, Ev. Diakonie-Krankenhaus gGmbH, Bremen
2006 - 2007	Chirurgie, Klinik für Chirurgie, Visceral- und Unfallchirurgie, Klinikverbund Bassum & Sulingen
2007 -	Orthopädie, DRK – Anstalten Wesermünde Seepark, Langen-Debstedt

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

1999 – 2008	Promotion in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Eppendorf (Hamburg)
-------------	---

Poster

Steinhagen J , Bruns J, Klebig F, Domm C, Schuenke M and Kurz B (2002):
Modulation of Articular Chondrocyte Proliferation and Matrix Deposition by Free Periosteal Grafts in vitro
4th Symposium ICRS, Toronto, Kanada 15.-18.06.2002

Vorträge

Steinhagen J, Rüther W, Petersen J, Klebig F, Bruns J, Schünke M, Kurz B (2004)
Einfluss des Periostes auf isolierte Chondrozyten in vitro
XXVI. Münchner Symposium für experimentelle Orthopädie, München 6.-7. Februar 2004

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

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

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

Unterschrift: