

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Komm. Leiterin: PD Dr. med. Kerstin Neumann)

**Einfluss von Extrazellulärmatrix-Molekülen auf das Tissue Engineering von  
Knorpelgewebe**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christian Andreas Georg Egger  
geboren am 23.06.1978 in München

Betreuerin: PD Dr. med. K. Neumann

Gutachter: PD Dr. med. K. Neumann  
PD Dr. A. Bernstein  
Prof. Dr. med. C. Arens (Magdeburg)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 16.12.2010

## Referat

Die Herstellung von Knorpelgewebe durch Tissue Engineering ist eine viel versprechende Option für zukünftige Rekonstruktionen von Knorpeldefekten im Kopf-Hals-Bereich. Nicht-resorbierbares poröses Polyethylen könnte dabei als Biomaterial eine Alternative zu den bisher erforschten resorbierbaren Materialien darstellen. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde untersucht, ob sich die Beschichtung des Polyethylens mit Molekülen aus der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes positiv auf die Adhäsion von Chondrozyten und deren Synthese von Extrazellulärmatrix-Molekülen auswirkt.

Die Anzahl adhärenter Zellen auf den unterschiedlich beschichteten Polyethylen-Oberflächen wurde mit dem WST-1-Assay photometrisch bestimmt und mit der Zellzahl auf unbehandelten Oberflächen verglichen. Zur Beurteilung der Synthese von ECM-Molekülen durch die Chondrozyten wurden die zellbesiedelten Polyethylen-Proben über einen Zeitraum von 5 Tagen bis zu 5 Monaten kultiviert und danach immunhistochemisch untersucht.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl von adhärenenten Zellen auf Polyethylen-Oberflächen, welche mit Kollagen II beschichtet worden waren. Der Zusatz von FKS zum Inkubationsmedium erbrachte keinen zusätzlich positiven Effekt in Bezug auf die Zelladhäsion. Die immunhistochemischen Untersuchungen konnten keinen Einfluss der oberflächengebundenen Moleküle auf die ECM-Synthese der adhärenenten Chondrozyten nachweisen. Im Verlauf der Dauer der Kultivierung kam es zur Dedifferenzierung der Zellen und damit nicht zur Ausbildung von knorpeligen Strukturen.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass poröses Polyethylen durch die Bindung von bestimmten Molekülen der extrazellulären Matrix als Biomaterial für das Tissue Engineering verbessert werden kann, jedoch war eine Beibehaltung des differenzierten Phänotyps der Zellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht zu erreichen.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1 Möglichkeiten des Knorpelersatzes	1
1.2 Tissue Engineering	2
1.2.1 Zellen und Zellkultur	3
1.2.2 Biomaterialien	4
1.2.3 ECM-Moleküle	4
<b>2 Ziel der Studie</b>	<b>7</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>8</b>
3.1 Medpor®	8
3.2 Chondrozyten	8
3.2.1 Gewinnung des Knorpelgewebes	8
3.2.2 Isolierung von Knorpel-Primärzellen	8
3.3 Immobilisierung von ECM-Molekülen an PE-Oberflächen	9
3.4 Nachweis der ECM-Moleküle auf PE-Oberflächen mit ELISA	10
3.5 Bestimmung der adhärenen Chondrozyten mit MTT- und WST-1- Assays	12
3.6 Immunhistochemie	13
3.7 Statistik	14
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>16</b>
4.1 Nachweis der ECM-Moleküle auf PE-Oberflächen mit ELISA	16
4.2 Bestimmung der adhärenen Chondrozyten	17
4.2.1 Ermittlung der optimalen Testbedingungen für den WST-1-Assay	17
4.2.2 Einfluss der ECM-Beschichtungen auf die Zelladhäsion	18
4.3 Einfluss des Zusatzes von FKS zum Inkubationsmedium	21
4.4 Charakterisierung der Hybridsysteme durch immunhistochemischen Nachweis der ECM-Expression	22
4.4.1 Einfluss der ECM-Beschichtung der PE-Oberflächen	22
<b>5 Diskussion</b>	<b>33</b>
5.1 Einfluss von ECM-Molekülen auf die Zelladhäsion von Chondrozyten an PE-Oberflächen	33
5.1.1 Diskussion der Methode zur Immobilisation von Proteinen	34
5.1.2 Wahl der Messmethoden	35
5.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Adhäsionsassays	36
5.1.4 Einfluss des Zusatzes von FKS zum Inkubationsmedium	39

5.2	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	40
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	
<b>10</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	
<b>11</b>	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b>	
<b>12</b>	<b>Hinweis auf Publikation von Ergebnissen dieser Arbeit</b>	
<b>13</b>	<b>Danksagung</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin
CO I	Kollagen Typ 1
CO II	Kollagen Typ 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FKS	Fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
GAG	Glykosaminoglykane
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GFOGER	Glycin-Phenylalanin-Hydroxyprolin-Glycin-Glutamat-Arginin
GRGDS	Glycin-Arginin-Glycin-Aspartat-Serin
HRP	Horseradish peroxidase
Int $\beta$ 1	Integrin $\beta$ 1
LSAB	Labelled Streptavidin Biotin
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium, inner salt
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyl tetrazolium bromide
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylen
PPE	Poröses Polyethylen
PGA	Polyglycolic Acid
PLGA	Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)
PLLA	Poly-L-Lactide Acid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RGDF	Arginin-Glycin-Aspartat- Phenylalanin
RGDS	Arginin-Glycin-Aspartat-Serin
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung (standard deviation)

VN	Vitronektin
WST-1	4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat

# **1 Einleitung und Problemstellung**

Knorpelgewebe hat aufgrund seiner Avaskularität und der niedrigen mitotischen Aktivität der Chondrozyten im Gegensatz zu anderen Körpergeweben eine niedrige Proliferationsrate und folglich ein sehr schlechtes Heilungspotential nach Zerstörung (Nehrer et al. 1997).

Dies stellt besonders in der Kopf-Hals-Chirurgie ein großes Problem dar, wenn knorpelige Strukturen, vor allem Ohren und Nase, bei Patienten mit kongenitalen, posttraumatischen oder postoperativen Defekten funktionell und ästhetisch wiederhergestellt werden sollen (Sclafani et al. 1997, Rotter et al. 2005). Hier entsteht ein Bedarf an Ersatzmaterialien, der auf verschiedene Weise gedeckt werden kann.

## **1.1 Möglichkeiten des Knorpelersatzes**

Die heute noch immer gebräuchlichste Methode zur Rekonstruktion von knorpeligen Defekten an Nase und Ohr ist die autologe Transplantation von Knorpel. Dabei wird dem Patienten eigenes Knorpelgewebe, beispielsweise aus dem Nasenseptum, der Ohrmuschel oder der Rippe, entnommen und an die zu rekonstruierende Stelle transplantiert (Araco et al. 2006). Dies hat im Gegensatz zu der allogenen Transplantation, bei der Knorpelgewebe eines anderen Individuums übertragen wird, den Vorteil der Vermeidung von Abstoßungsreaktionen und eines sehr geringen Risikos der Übertragung von Infektionen. Jedoch können sich durch den zusätzlichen chirurgischen Eingriff Probleme, wie zum Beispiel Wundinfektionen, ergeben, die zu weiteren Komplikationen führen können. Außerdem ist das kosmetische Ergebnis bei dieser Methode oft unbefriedigend, da das Transplantat sehr schlecht in die gewünschte Form, zum Beispiel die einer Ohrmuschel, gebracht werden kann. Das Hauptproblem stellt jedoch, besonders bei der Rekonstruktion von größeren Defekten, die geringe Verfügbarkeit von autologem Knorpelgewebe dar (Naumann et al. 2004, Rotter et al. 2005).

Diese Probleme führten in den letzten Jahren zum vermehrten Einsatz von alloplastischen Materialien wie Silikon, Hydroxylapatit und Polyethylen. Da es sich hierbei jedoch um Fremdkörper für den Organismus handelt, wird das Implantat oftmals nur schlecht in das umliegende Gewebe integriert. Somit besteht ein hohes Risiko für Infektionen und Abstoßung, vor allem wenn in eine chronisch infizierte Umgebung oder in vernarbtes Gewebe implantiert werden muß (Sclafani et al. 1997, Naumann et al. 2004). Zudem kann eine künstliche Prothese nicht in gleichem Maße wie natürlicher Knorpel auf äußere Belastung reagieren.

Mit der Entwicklung von porösen Materialien (z.B. porösem Polyethylen) konnte die Integration ins Gewebe verbessert werden, da die Porosität das Einwachsen von Blutgefäßen und Körpergewebe in, sowie die Zirkulation von Gewebeflüssigkeit durch das Implantat ermöglicht (Wellisz et al. 1993, Sclafani et al. 1997). Ein Beispiel ist Medpor<sup>®</sup>, ein hochdichtes

poröses Polyethylen, welches seit vielen Jahren erfolgreich in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie eingesetzt wird (Wellisz 1993, Romo et al. 1998). Trotz dieser Vorteile kommt es auch bei Anwendung von porösen Materialien immer wieder zu Komplikationen, besonders Abstoßung mit nachfolgender Infektion, was oft eine Entfernung des Implantats nötig macht. Dies kann besonders im Nasen- und Ohrenbereich auftreten, wenn nur eine dünne Gewebeschicht zur Deckung des Implantats vorhanden ist (Wellisz et al. 1993, Cenzi et al. 2005). In einem Fall wird in der Literatur auch von einem Bruch des Implantats berichtet (Öztürk et al. 2002).

## **1.2 Tissue Engineering**

Da noch keine der oben genannten Methoden das optimale Verfahren zur Rekonstruktion von Knorpeldefekten im Kopf-Hals-Bereich darstellt, wird weiterhin nach Alternativen gesucht. Eine in den letzten Jahren intensiv erforschte, viel versprechende Methode ist die Herstellung von körpereigenem Knorpelgewebe durch Tissue Engineering.

Langer und Vacanti (1993) definierten diesen Begriff als ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches die Methoden von Ingenieur- und Biowissenschaften anwendet, um biologische Ersatzmaterialien zu entwickeln, die die Funktion eines Körpergewebes wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern. In den meisten Fällen wird die in vitro Herstellung von körpereigenem Gewebe angestrebt, indem zuvor gewonnene körpereigene Zellen auf geeignete, resorbierbare, natürliche oder synthetische Polymermatrices aufgebracht werden (Langer 1997). Nach einer gewissen Kultivierungszeit in vitro kann das neu entstandene Gewebe an die gewünschte Stelle im Körper implantiert werden. Danach soll die Matrix bis zu ihrem vollständigen Abbau dem Implantat so lange Stabilität verleihen, bis die Zellen in die Umgebung integriert sind. Außerdem soll sie Zellorganisation und -wachstum steuern, sowie die Diffusion von Nährstoffen zu den Zellen ermöglichen (Lalan et al. 2001).

Im Vergleich zu anderen Ersatzverfahren bietet Tissue Engineering eine Reihe von Vorteilen: Es wird körpereigenes Gewebe implantiert, wodurch Abstoßung und Infektionsübertragung vermieden werden und das hergestellte Transplantat sich durch formgebende Matrices theoretisch in jede gewünschte Form bringen lässt. Auch das Problem der geringen Verfügbarkeit des Ersatzgewebes, wie bei der autologen Transplantation, kann hier vermieden werden, da als Ausgangsmaterial Knorpelzellen verwendet werden, welche in vitro vermehrt werden können.

Die Herstellung von autologem Knorpel ist eines der am weitesten fortgeschrittenen Forschungsgebiete im Bereich des Tissue Engineering. Mit verschiedenen Methoden ist es bisher gelungen vitales knorpelähnliches Gewebe sowohl in vitro, als auch in vivo herzustellen



(Haisch et al. 2002, Kamil et al. 2004). Doch während diese Methode im orthopädischen Bereich bereits erfolgreich klinisch angewendet wird (z.B. Carticel<sup>®</sup>), ist deren Einsatz in der rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich bisher nicht erfolgreich gewesen. Die Gründe hierfür sind die subkutane Implantation, die zu starken Entzündungsreaktionen und Resorption des hergestellten Knorpels führen kann, sowie die meist nicht ausreichende anfängliche Stabilität des Konstrukts (Rotter et al. 2005). Daher sind weitere Untersuchungen auf der Ebene von Zelle, Zellkulturmethoden und Biomaterialien nötig, um eine Verbesserung der in vitro hergestellten Knorpeltransplantate zu erreichen.

### **1.2.1 Zellen und Zellkultur**

Für das Knorpel-Tissue-Engineering wird eine große Anzahl von Chondrozyten benötigt. Die aus dem Körper isolierten Zellen müssen daher zunächst in vitro vermehrt werden. Die herkömmlichste Methode ist die Monolayerkultur, das heißt Vermehrung der Zellen in Kulturflaschen in Nährmedium mit Zusatz von FKS, Ascorbinsäure und Antibiotika (Lin et al. 2006). Mit dieser Methode ist eine technisch einfache und schnelle Zellamplifikation möglich, jedoch tritt bereits nach wenigen Passagierungen eine Dedifferenzierung der Chondrozyten ein (Benya und Shaffer 1982, Darling und Athanasiou 2005). Die Zellen nehmen zunehmend einen fibroblasten-ähnlichen Phänotyp an und stellen die Synthese von Proteoglykanen und knorpelspezifischem Kollagen Typ II ein. Stattdessen kommt es zur verstärkten Bildung von Kollagen Typ I.

Durch Kultivierung der Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung, zum Beispiel in gelartigen oder festen porösen Polymeren, kann eine Beibehaltung der Differenzierung bzw. eine Redifferenzierung erreicht werden (Benya und Shaffer 1982, Chen et al. 2003).

In der Regel werden die Chondrozyten deshalb zunächst für einige wenige Passagen in Monolayerkultur vermehrt und anschließend in eine dreidimensionale Matrix zur weiteren Kultivierung überführt.

Eine alternative Methode zur Aufrechterhaltung des Phänotyps ist die Pellet-Kultur, bei der eine extrem hohe Zelldichte erreicht wird (Lin et al. 2006). Studien haben gezeigt, dass dadurch ohne den Einsatz von Trägermaterialien Knorpel synthetisiert werden kann, ohne dass eine Dedifferenzierung der Zellen auftritt (Zhang et al. 2004).

Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) ist ein neuerer, vielversprechender Ansatz. MSC's haben eine hohe Proliferationsrate, können leicht aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe gewonnen werden und in vitro in eine Reihe von Zelltypen, unter anderem Chondrozyten, differenzieren (Raghunath et al. 2005, Lin et al. 2006).

### **1.2.2 Biomaterialien**

Eine bereits klinisch angewendete Methode des Tissue Engineering von Knorpelgewebe ist die Rekonstruktion von Knorpeldefekten im Kniegelenk durch alleinige Injektion von kultivierten autologen Chondrozyten (Brittberg et al. 1994). Der weitaus häufigere Ansatz ist jedoch die Kombination von Zellen und resorbierbaren Biomaterialien.

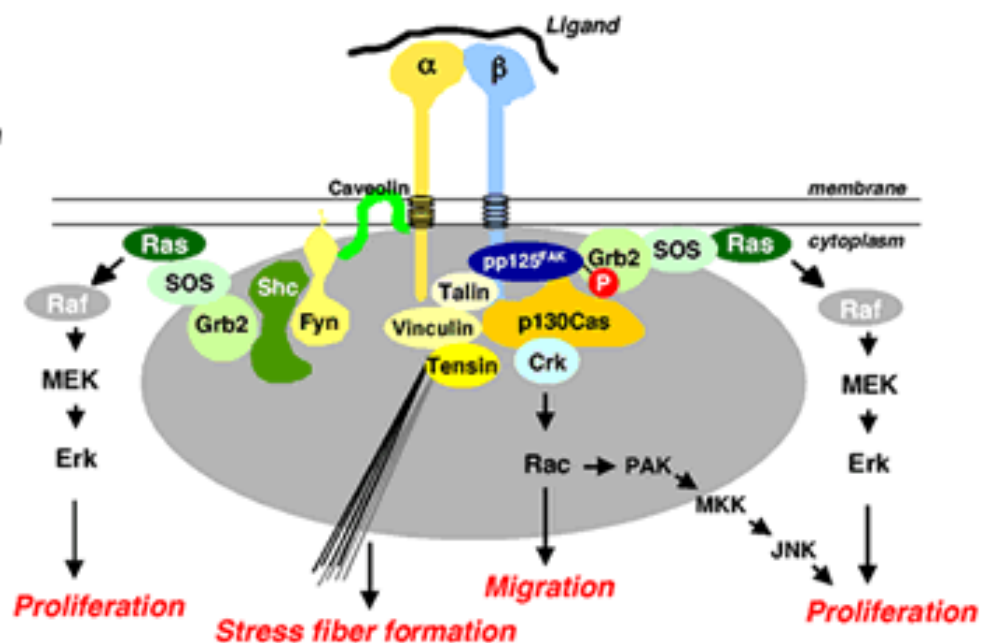
Ein Biomaterial, das für die Herstellung von Knorpel geeignet ist, sollte folgende Anforderungen erfüllen: gute Biokompatibilität, gleichmäßige Zellverteilung und anfängliche mechanische Stabilität nach Transplantation (Risbud und Sittering 2002). Natürliche Polymergele, wie zum Beispiel Kollagen (Nehrer et al. 1997), Hyaluronsäure (Marcacci et al. 2005, Nehrer et al. 2006), Fibrin (Silverman et al. 1999), Agarose, Alginat und Chitosan (Donati et al. 2005), wurden bereits erfolgreich eingesetzt. Diese Gele bilden eine dreidimensionale Matrix, in der eine gleichmäßige Zellverteilung, sowie eine Beibehaltung des differenzierten Phänotyps der Chondrozyten möglich ist (Benya und Shaffer 1982, Sittering et al. 2004). Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die fehlende mechanische Stabilität der Zell-Gel-Konstrukte, die besonders bei der Anwendung im Kopf-Hals-Bereich nötig ist (Sittering et al. 1994).

Als Alternative wurden daher feste, resorbierbare Polymergerüste mit poröser Struktur untersucht. Die Polymermatrix soll dem neuen Knorpelgewebe initial Stabilität verleihen und nach der Implantation kontinuierlich abgebaut werden, während die mechanischen Eigenschaften zunehmend von der neu gebildeten Knorpelmatrix übernommen werden. Unter Einsatz der synthetischen Polymere PLLA, PGA und PLGA (Copolymer aus PLLA und PGA) ist es vielfach gelungen Knorpel in vitro herzustellen (Puelacher et al. 1994, Rotter et al. 1998, Haisch et al. 2002). Jedoch konnte auch hier bisher nur begrenzte mechanische Stabilität erreicht werden, da die in vitro hergestellte Knorpelmatrix in ihrer Zusammensetzung noch nicht der natürlichen entspricht (Homicz et al. 2002). Ein weiteres Problem könnte in einer Anhäufung von zelltoxischen Abbauprodukten durch zu raschen Abbau der Materialien bestehen (Sittering et al. 1996).

### **1.2.3 ECM-Moleküle**

Eine wichtige Voraussetzung für eine regelrechte Zellfunktion und Matrixsynthese, und damit für die Entstehung von funktionalem Knorpelgewebe, ist eine ausreichende Interaktion zwischen den Zellen und dem Polymer (Yoon et al. 2004). In natürlichem Knorpel nehmen die Chondrozyten nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtvolumen ein, über 90% davon wird dagegen von der extrazellulären Matrix gebildet (Hunziker et al. 2002). Deren Hauptbestandteile sind Kollagen Typ II und Proteoglykane.

In den letzten Jahren durchgeführte Gen-Expressionsanalysen zeigen das für die Entwicklung von Knorpel nötige komplexe Zusammenspiel von ca. 900 Genen (Cameron et al. 2009). Sowohl bei der Knorpelentwicklung als auch bei der Redifferenzierung von Knorpelzellen wurden Gene identifiziert, die die Expression von ECM-Molekülen und Integrinen regulieren (Tallheden et al. 2004). Die Chondrozyten binden über membranständige Integrin-Rezeptoren an verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Kollagen und die adhäsiven Glykoproteine Fibronectin (FN) und Vitronectin (VN) (Rosso et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass hierbei die Integrine mit  $\beta_1$ -Untereinheit, besonders  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_1$ -Integrine, die entscheidende Rolle spielen (Kurtis et al. 2003). In vielen ECM-Molekülen, unter anderem FN und VN, wird die Zellbindung von der Tripeptidsequenz RGD (Arg-Gly-Asp) vermittelt, die in diesen Molekülen mehrfach vorkommt (Pierschbacher und Ruoslahti 1984, Rosso et al. 2004). Diese Zell-ECM-Interaktionen lösen eine Kaskade von intrazellulären Vorgängen aus (Svoboda 1998, Abb.1), durch die schließlich wichtige zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung beeinflusst werden (Ruoslahti 1991).



**Abb. 1:** Integrin-vermittelte Signaltransduktion

Für die Entstehung von Knorpelgewebe durch Tissue Engineering ist es daher wichtig, dass die Umgebung der Zellen der natürlichen Matrix möglichst ähnlich ist. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, ist die Modifikation von Polymeroberflächen durch Immobilisierung von natürlichen und synthetischen ECM-Molekülen. Verschiedene Studien zeigten einen positiven Einfluss der Oberflächenmodifikation unterschiedlicher Biomaterialien mit Kollagen (Sittinger et al. 1996, Cheng und Teoh 2004, Ma et al. 2005), Fibronectin (Klee et al. 2003), Vitronectin (Schleicher

et al. 2005) oder synthetisch hergestelltem RGD-Peptid (Glass et al. 1996, Hu et al. 2003, Yoon et al. 2004, Lieb et al. 2005) auf Zelladhäsion und Differenzierung.

## **2 Ziel der Studie**

Trotz bemerkenswerter Fortschritte auf dem Gebiet des Knorpel-Tissue-Engineering ist dessen Einsatz in der rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich noch nicht möglich. Dies liegt hauptsächlich an der fehlenden langfristigen Formstabilität des in vitro hergestellten Knorpels in vivo und dessen Resorption in den subkutanen Transplantationsstellen.

Ein neuer Ansatz zur Lösung dieser Probleme ist die Herstellung eines „Hybridsystems“ aus einem nicht-resorbierbaren ultrahochmolekularen porösen Polyethylen (Medpor<sup>®</sup>) und darauf angezüchteten körpereigenen Zellen mittels Tissue Engineering.

Poröses Polyethylen (PPE) besitzt mit seiner hohen Porosität, der guten Biokompatibilität und Formstabilität Eigenschaften, die es als Matrix für Tissue Engineering theoretisch geeignet machen. Röpke et al. (2007) zeigten, dass auf PPE kultivierte Chondrozyten in der Lage sind Knorpelgewebe in vitro zu synthetisieren. Zudem ergaben parallel durchgeführte Untersuchungen im Tiermodell, daß die Besiedelung mit Chondrozyten die Integration dieses Biomaterials in das Gewebe verbessern kann (Schön et al. 2005, 2009).

Das Ziel dieser Studie war es, erstens, zu untersuchen, ob durch eine Beschichtung der PE-Oberflächen mit ECM-Molekülen die Anzahl der adhärenenten, vitalen Chondrozyten erhöht werden kann. Dazu wurden, in Monolayerkultur vermehrte, humane Chondrozyten auf PE-Proben aufgebracht, die zuvor mit Kollagen II, FN, VN, RGDS oder GRGDS beschichtet worden waren. Nach 24 h Kultivierung in vitro wurde die Zelladhäsion an beschichtetes und unbeschichtetes PE bestimmt und miteinander verglichen.

Zweitens sollte der Einfluss dieser oberflächengebundenen ECM-Moleküle auf die ECM-Synthese der adhärenenten Chondrozyten, besonders hinsichtlich Unterschieden im zeitlichen Verlauf, bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Chondrozyten über einen Zeitraum von einigen Tagen bis Monaten auf PE-Proben, die wie oben angegeben beschichtet waren, kultiviert und anschließend die Proben immunhistochemisch auf die Expression von Kollagen I und II, FN, VN, Elastin, Tenascin und Integrin  $\beta 1$  untersucht. Im zeitlichen Verlauf wurde dabei besonders die Expression von Kollagen I und II betrachtet, da diese Moleküle die beste Information über den Differenzierungsgrad der Chondrozyten geben.

## **3 Materialien und Methoden**

### **3.1 Medpor®**

Medpor® ist ein von der Firma Porex Surgical Products Group hergestelltes Implantatmaterial aus linearem hochverdichtetem Polyethylen. Es besitzt eine vernetzte, offenporige Struktur mit einer durchschnittlichen Porengröße von >100 µm. Polyethylen ist ein teilkristalliner, thermoplastischer Kunststoff mit der Formel  $[-CH_2 - CH_2-]_n$ , der durch Polymerisation von Ethen hergestellt wird.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden aus Medpor®-Platten mit einer Dicke von 0,85 mm (Catalog No. 7210 und 7212) kreisrunde Proben mit einem Durchmesser von 6 bzw. 8 mm ausgestanzt. Diese wurden vor Durchführung der Versuche von beiden Seiten für jeweils 15 Minuten unter UV-Licht sterilisiert.

### **3.2 Chondrozyten**

#### **3.2.1 Gewinnung des Knorpelgewebes**

Die für die Versuche verwendeten Chondrozyten wurden aus humanem Septumknorpelgewebe gewonnen, welches bei operativen Eingriffen im Nasenbereich anfiel und sonst verworfen worden wäre. Die Eingriffe wurden an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgenommen und umfassten Patienten verschiedenen Alters und Geschlechts.

Die Knorpelstücke wurden in GBSS + 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) aus dem Operationssaal ins Labor transportiert und dort unmittelbar danach verarbeitet.

#### **3.2.2 Isolierung von Knorpel-Primärzellen**

Die Isolierung der Knorpelzellen aus dem Gewebe wurde in leicht modifizierter Weise nach der Beschreibung von Freshney (1999) durchgeführt.

#### **Chemikalien:**

GBSS-Puffer	Gey`s Balanced Salt Solution, SIGMA®-G9779 500 ml
Trypsin	SIGMA® Trypsin T-7409 10g
Collagenase	Gibco™ Collagenase Type II lyophilized, Cat.No. 17101-015 275,00 units/mg (1g)

Hyaluronidase	Serva, Hyaluronidase from ovine testes min. 1000 U/mg lyophil., 25118.02, 500 mg
Knorpelmedium	DMEM (Gibco™ 21885, DMEM+GlutaMAX™, 500 ml) bzw. RPMI (Gibco™, RPMI 1640 Medium, 500 ml, Cat.No. 32404-014) + FKS 12% bzw. 20% + Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) 1% + MgCl <sub>2</sub> 1% + Ascorbinsäure 1%

Zunächst wurden die Knorpelstücke unter sterilen Bedingungen in einer Petri-Schale mit GBSS + 1% Antibiotika mit Skalpell (Nr.11 und 20 von Braun) von Gewebe- und Knochenresten befreit.

Dann wurden die gesäuberten Knorpelstücke in frischem GBSS + 1% Antibiotika in 1-2 mm<sup>3</sup> große Stückchen geschnitten, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, und nacheinander mit 0,8 %iger Hyaluronidase, 0,25 %igem Trypsin und 0,2 %iger Collagenase in GBSS-Puffer inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils mit GBSS + 1% Antibiotika gewaschen.

Nach Inkubation mit Collagenase wurde der Knorpel mit frischer Collagenase-Lösung über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die entstandene Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 oder 70 µm pipettiert und mit Knorpel-Medium unter Zusatz von 20% FKS im Verhältnis 1:1 gemischt, um die Enzymaktivität der Collagenase zu stoppen. Anschließend wurde die Lösung für 8 min bei 800 rpm (180 x g) zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in frischem Medium mit 20% FKS aufgenommen.

Die Bestimmung der Anzahl von vitalen Zellen in der Suspension wurde mit Hilfe der Tyrode-Eosin-Methode durchgeführt. Dafür wurde ein Aliquot aus der Zellsuspension 1:5 mit Tyrode-Eosin verdünnt und die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Nur die toten Zellen nehmen den Farbstoff auf und färben sich rot, während die vitalen Zellen ungefärbt bleiben.

Nach der Auszählung der Zellen wurde erneut zentrifugiert, das Zellpellet in Knorpel-Medium mit 12% FKS aufgenommen und die Suspension in einer Zelldichte von 2,5x10<sup>4</sup> pro cm<sup>2</sup> in eine Kulturflasche eingesät und bis zu 3 Passagen weiter vermehrt.

### **3.3 Immobilisierung von ECM-Molekülen an PE-Oberflächen**

Die Methode zur Immobilisierung von ECM-Molekülen an PE-Oberflächen orientiert sich an der Beschreibung der Collagenbeschichtung von Oberflächen nach Freshney (1999).

**Chemikalien:**

1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)carbodiimide-metho-p-Toluenesulfonate,

SIGMA<sup>®</sup> C-1011 (5g)

Collagen II	SIGMA <sup>®</sup> C7806	Stammlösung 2,5 mg/ml in 0,5 N CH <sub>3</sub> COOH
Fibronektin	SIGMA <sup>®</sup> F2006	Stammlösung 1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)	SIGMA <sup>®</sup> A9041	Stammlösung 2,5 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS)	SIGMA <sup>®</sup> G4391	Stammlösung 2,5 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Vitronektin	SIGMA <sup>®</sup> V-9881	Stammlösung 50µg/ml in H <sub>2</sub> O
PBS-Puffer	Gibco <sup>™</sup> 14190 DPBS 1x,	100 ml

Die PE-Proben wurden zunächst mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen und daraufhin zu je 4-8 Stück in Eppendorfcups vorgelegt.

2 mg Cyclohexylcarbodiimid wurden in 14 ml Aqua bidest. gelöst und je 2 ml dieser Lösung auf die Eppendorfcups mit den PE-Proben verteilt.

Daraufhin wurde die Kopplungsreaktion durch Zugabe eines 40 µg entsprechenden Aliquots der jeweiligen Protein- bzw. Peptidlösung gestartet und bei Raumtemperatur für 3 Stunden auf dem Rollenschüttler inkubiert.

Anschließend wurden die Proben mit Aqua bidest. gewaschen und über Nacht luftgetrocknet. Vor der Besiedelung mit Chondrozyten wurden die Proben am nächsten Tag von jeder Seite für jeweils 15 Minuten unter der UV-Lampe sterilisiert.

**3.4 Nachweis der ECM-Moleküle auf PE-Oberflächen mit ELISA****Chemikalien:**

1x PBS

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 26,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
- 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Die Salze wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O gelöst, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, mit Wasser auf das Endvolumen 1l aufgefüllt und autoklaviert.

Blockierungsreagenz:

1% BSA (SIGMA<sup>®</sup> A-7888, Albumin, Bovine, gelöst in PBS)



1. Antikörper:

Affinity purified anti collagen Type II (rabbit), 1:8000 verdünnt in 1% BSA/PBS,  
Rockland CODE 600-401-104-0.5

Antifibronektin SIGMA® F-3648 (rabbit), 1:10000 verdünnt in 1% BSA/PBS

2. Antikörper:

Anti rabbit IgG, alkalische Phosphatase markiert SIGMA® A3037, 1:5000 verdünnt in  
PBS/BSA

ELISA-Substratlösung:

Alkaline Phosphatase yellow (pNPP) liquid substrate system for ELISA (SIGMA® A-3469) 100  
ml

Substratpuffer:

Diethanolamine pH 9,5 10mM

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,5 mM

1 ml Diethanolamin pro Liter Wasser gemeinsam mit 101,5 mg Magnesiumchlorid gelöst

3N NaOH

Zur Bestimmung der gebundenen Menge von Kollagen II bzw. Fibronektin wurden die proteinbeschichteten PE-Proben in die Wells einer 48-Well-Platte gegeben und zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1%iger BSA/PBS-Lösung (250 µl/Well) die unspezifischen Bindungsstellen blockiert.

Danach folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (200 µl/Well) in der jeweiligen Verdünnung (s.o.) über 48 Stunden bei 4°C.

Anschließend wurden die Proben 3x mit 250 µl PBS gewaschen und dann für zwei Stunden mit dem 2. Antikörper (200 µl/Well) in der entsprechenden Verdünnung (s.o.) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem 3x Waschen mit 250 µl PBS wurden die Proben in neue Wells überführt und 1x mit 250 µl Substratpuffer gewaschen.

Danach wurden die Proben für 30 Minuten in der Dunkelheit mit der ELISA-Substratlösung inkubiert (200 µl/Well). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 3N NaOH abgestoppt.

Als Letztes wurden jeweils 200 µl der Reaktionslösung in die Wells einer 96-Well-Platte überführt und die Extinktion bei 405 nm in einem Microtiter-Platten-Lesegerät gemessen.

Im selben Ansatz wurden neben den proteinbeschichteten Proben auch solche ohne Beschichtung verwendet, um die unspezifische Bindung des 1. Antikörpers an die Proben zu bestimmen. Abziehen dieser Extinktionswerte vom Gesamtwert ergab die spezifische Bindung an Kollagen II bzw. Fibronectin.

### **3.5 Bestimmung der adhärennten Chondrozyten mit MTT- und WST-1- Assays**

#### **Chemikalien:**

MTT	SIGMA <sup>®</sup> , M5655 – 500 mg, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
WST-1	Roche Cat.No. 1 644 807, Cell Proliferation Reagent WST-1
RPMI	Gibco <sup>™</sup> , RPMI 1640 Medium, 500 ml, Cat.No. 32404-014
n-Propanol	MERCK Cat.No.1.0097.1000

Zur quantitativen Bestimmung der auf PE-Proben und in der Multiwell-Platte adhärennten Chondrozyten wurden zwei Tests verwendet, die beide auf der enzymatischen Umsetzung von Tetrazoliumsalzen zu Formazanprodukten durch das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase in vitalen Chondrozyten basieren.

Zum einen wurde der MTT-Assay angewendet, wie von Miller und McDevitt (1991) beschrieben. Dabei wird 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) enzymatisch zu einem blauen, unlöslichen Formazanprodukt umgesetzt, dessen optische Dichte nach Auflösen in Propanol photometrisch gemessen wird. Die Höhe der Extinktionswerte korreliert daher mit der Menge an vitalen Zellen im Versuch. MTT wurde unmittelbar vor Gebrauch in einer Konzentration von 1 mg/ml in RPMI-Medium gelöst.

Als Alternative wurde der WST-1-Assay verwendet, bei dem wasserlösliches WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat) zu einem gelb-orangen, wasserlöslichen Formazanprodukt umgesetzt wird. Für den Gebrauch in diesen Versuchen wurde eine Lösung von WST-1 in RPMI-Medium + 12% FKS 1:10 hergestellt.

Kultivierte Zellen in der zweiten bis dritten Passage wurden wie üblich mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt.

Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Knorpel-Medium mit und ohne Zusatz von FKS resuspendiert und auf eine Konzentration von 500 000 Zellen/ml eingestellt. Die unter der UV-Lampe sterilisierten PE-Proben (4-fach Bestimmung pro Kondition) wurden in die Wells einer 48-Well-Platte vorgelegt und 100 µl der Zellsuspension (entspricht 50 000 Zellen) pro Well und Probe darauf pipettiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl von Zellen auf den Boden der Wells ohne PE ausgesät.

Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden weitere 250 µl Medium pro Well zugegeben, um den Zellen das Überleben bis zum nächsten Tag zu ermöglichen.

Nach weiteren 21 h Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde das Medium abgesaugt und die Wells dreimal mit 200 µl GBSS pro Well gewaschen, um die nicht adhärenen und abgestorbenen Zellen zu entfernen.

Um diejenigen Zellen, welche aufgrund der Porosität des Materials nicht adhärten, getrennt von den adhärenen bestimmen zu können, wurden dann die Proben in neue Wells überführt und sowohl die in den ursprünglichen Wells verbleibenden, als auch die an den Proben adhärenen Zellen mit 200 µl der oben beschriebenen MTT- bzw. WST-1-Lösung pro Well für drei Stunden (MTT) bzw. zwei Stunden (WST-1) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Beim MTT-Assay wurde schließlich der Überstand abgesaugt und das gebildete Formazan mit 200 µl pro Well n-Propanol gelöst. WST-1 dagegen ist wasserlöslich und bedarf daher keines weiteren Arbeitsschrittes. In beiden Fällen wurden die 48-Well-Platten für 15 min. auf dem Schüttler bewegt und zuletzt aus jedem Well 100 µl des Substrates in ein neues Well einer 96-Well-Platte überführt und die Extinktion in einem Mikrotiter-Platten-Lesegerät bei 550 nm (MTT) bzw. 450 nm (WST-1, mit 630 nm als Referenz) gemessen.

### **3.6 Immunhistochemie**

Zur Charakterisierung der entstandenen Hybridsysteme wurden über unterschiedlich lange Zeiträume kultivierte Proben immunhistochemisch auf die Expression von knorpelspezifischen ECM-Molekülen untersucht.

Die Einbettung der Proben erfolgte mit Technovit 8100 der Firma Heraeus. Aus den Kunststoff-Blöcken wurden an einem Rotationsmikrotom (JUNG SUPER CUT 2065) Schnitte von 5 µm Stärke angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem ChemMate™ Detection Kit der Firma DakoCytomation durchgeführt. Dieses Nachweissystem basiert auf der LSAB- (Labelled Streptavidin-Biotin) Methode.

Als erstes erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 1% BSA/PBS, dann die Inkubation mit dem jeweiligen, in Tabelle 1 angegebenen, Primär-Antikörper für 1 Stunde.

**Tabelle 1:** Primärantikörper für die Immunhistochemie

	<b>Primär-Antikörper (Spezies)</b>	<b>Hersteller und Artikelnummer</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>CO I</b>	Anti Human Collagen I (Kaninchen)	Chemicon AB 745	1:50
<b>CO II</b>	Anti Human Collagen II (Kaninchen)	Chemicon MAB 8887	1:50
<b>FN</b>	Anti Human Fibronectin (Kaninchen)	Sigma F3648	1:300
<b>TN</b>	Anti Human Tenascin (Kaninchen)	Novacastra NCI-TENAS-C	1:50
<b>VN</b>	Anti Human Vitronectin (Kaninchen)	Acris BP 976	1:50
<b>Integrin <math>\beta</math>1</b>	Anti Integrin $\beta$ 1 (Maus)	Chemicon MAB 1965	1:100
<b>Elastin</b>	Anti Elastin (Maus)	Sigma E 4013	1:8000

Nach Spülung mit TBS-Puffer für 3 x 10 min. wurde mit dem Sekundär-Antikörper, ChemMate™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) für 30 min. inkubiert und anschließend erneut wie zuvor gespült.

Anschließend erfolgte die Zugabe des Streptavidin/HRP-Komplexes für 30 min., gefolgt von einer Spülung wie zuvor. Zum Färben wurde mit dem Farbstoff DAB inkubiert (20  $\mu$ l DAB-Chromogen in 1 ml ChemMate HRP-Buffer) und danach für 10 min. mit Aqua dest. gespült.

Die Gegenfärbung der Zellkerne (blau) wurde mit Hämalaun durchgeführt und die Schnitte nach dem Trocknen mit Entellan eingedeckt.

### **3.7 Statistik**

Soweit nicht anders angegeben sind alle Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Bei der statistischen Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurde, je nach Einflussfaktoren, die ein- bzw. mehrfaktorielle ANOVA angewendet. Als Post-Hoc Test wurde der Tukey-HSD-Test gewählt. Beim paarweisen Vergleich der Proben, welche in Medium mit bzw. ohne Zusatz von FKS kultiviert worden waren, kam der t-Test für unverbundene Stichproben zum Einsatz.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS Version 16. Statistische Signifikanz wurde jeweils bei p-Werten von  $\leq 0,05$  angenommen.

**Tabelle 2:** Signifikanzkriterien

$p > 0,05$	nicht signifikant
$p \leq 0,05$	Signifikant
$p \leq 0,01$	sehr signifikant
$p \leq 0,001$	Hochsignifikant

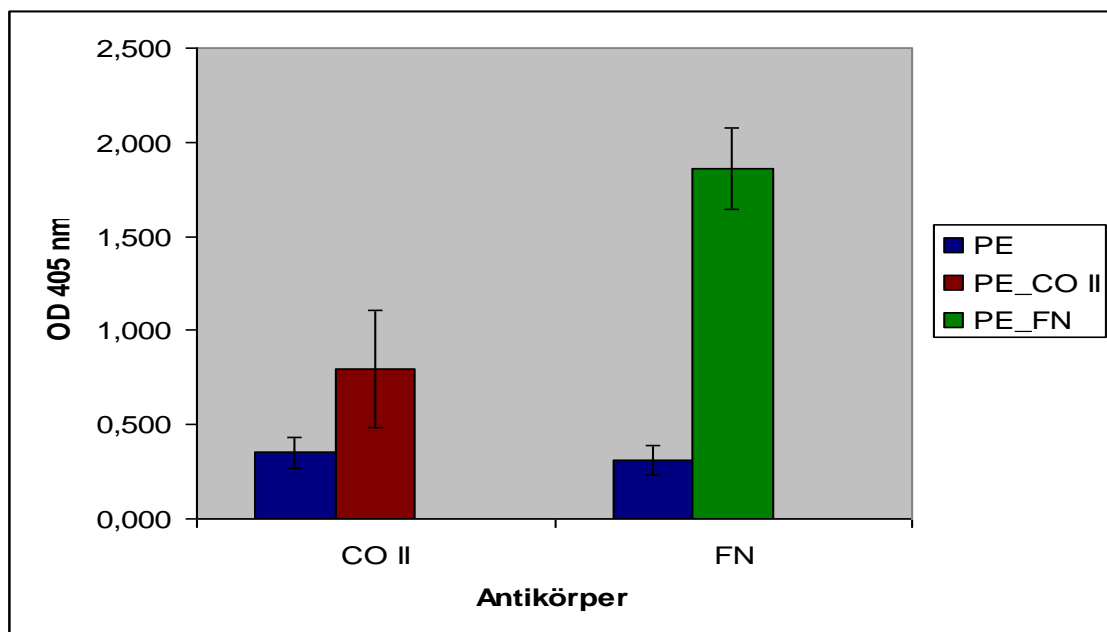
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der ECM-Moleküle auf PE-Oberflächen mit ELISA

Die Bindung der ECM-Moleküle Kollagen II und Fibronectin wurde mittels eines modifizierten ELISA semiquantitativ nachgewiesen. Abbildung 2 zeigt die bei 405 nm gemessenen Extinktionswerte der beschichteten PE-Proben (*PE\_CO II* bzw. *PE\_FN*) im Vergleich zu denen der nativen Proben (*PE*). Die Höhe der Extinktion korreliert direkt mit der Menge an gebundenem Antikörper gegen Kollagen II bzw. Fibronectin.

Die Messwerte zeigen, dass trotz der vorausgegangenen Blockierung der Proben mit BSA eine unspezifische Bindung des 1. Antikörpers an die PE-Oberflächen stattfindet. In beiden Fällen binden aber die CO II- bzw. FN-beschichteten Proben deutlich mehr Antikörper als die nativen Proben, was das Vorliegen dieser Moleküle auf den Proben beweist. Dabei waren die OD-Werte auf *PE\_FN* in allen Messungen deutlich höher als die von *PE\_CO II*.

Die unspezifische Bindung an PE (*PE*) war bei beiden Antikörpern in etwa gleich.



**Abb.2:** Spezifische und unspezifische Bindung von Anti-CO II und Anti-FN: Die blauen Säulen zeigen die unspezifische Bindung des jeweiligen 1. Antikörpers an unbeschichtete PE-Oberflächen, die rote Säule zeigt die spezifische Bindung von Anti-CO II, die grüne Säule diejenige von Anti-FN. Dargestellt sind die Mittelwerte der Extinktionswerte (n=7)  $\pm$  SD.

## 4.2 Bestimmung der adhärenenten Chondrozyten

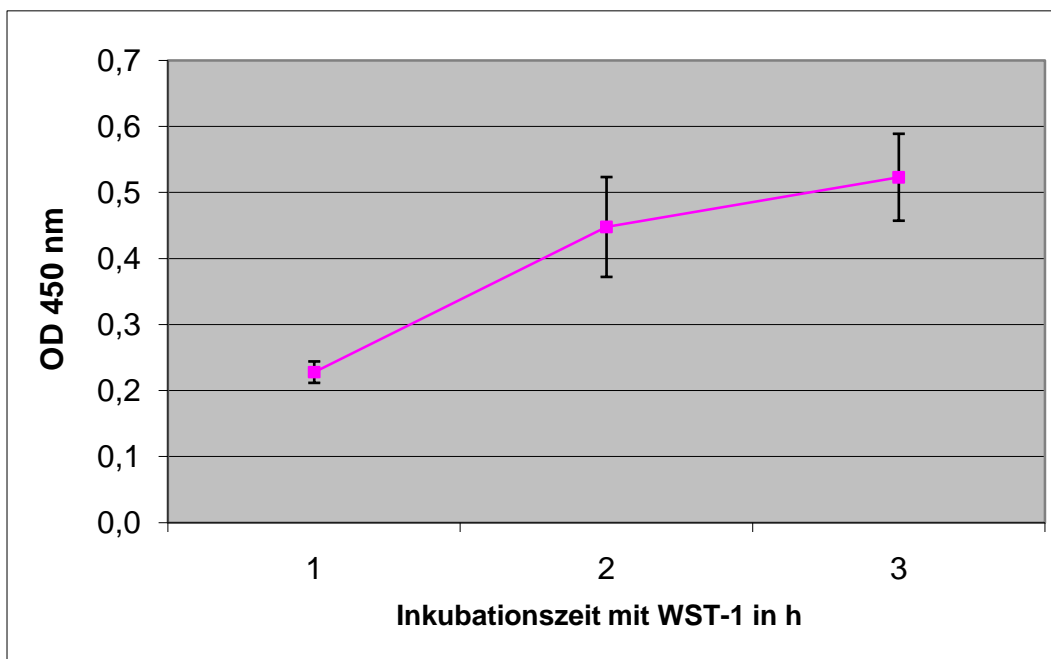
### 4.2.1 Ermittlung der optimalen Testbedingungen für den WST-1-Assay

Um die Durchführung des WST-1-Assays für den vorliegenden Versuchsaufbau zu optimieren, wurde vor Durchführung der Messungen die optimale Inkubationszeit der zellbesiedelten Proben mit WST-1 in einem Testversuch ermittelt.

Nach Kultivierung von Chondrozyten auf PE über 24 Stunden wurde WST-1-Lösung (1:10 verdünnt mit RPMI-Medium+12% FKS) zugegeben und die Extinktion nach einer, zwei und drei Stunden Inkubationszeit bei 450 nm gemessen.

Nach zwei Stunden Inkubation wurde eine doppelt so hohe Zelladhäsion wie nach einer Stunde gemessen. Von zwei auf drei Stunden zeigte sich jedoch ein flacherer Anstieg (Abb.3).

In allen folgenden Messungen wurde daher eine Inkubationszeit mit WST-1 von zwei Stunden gewählt.

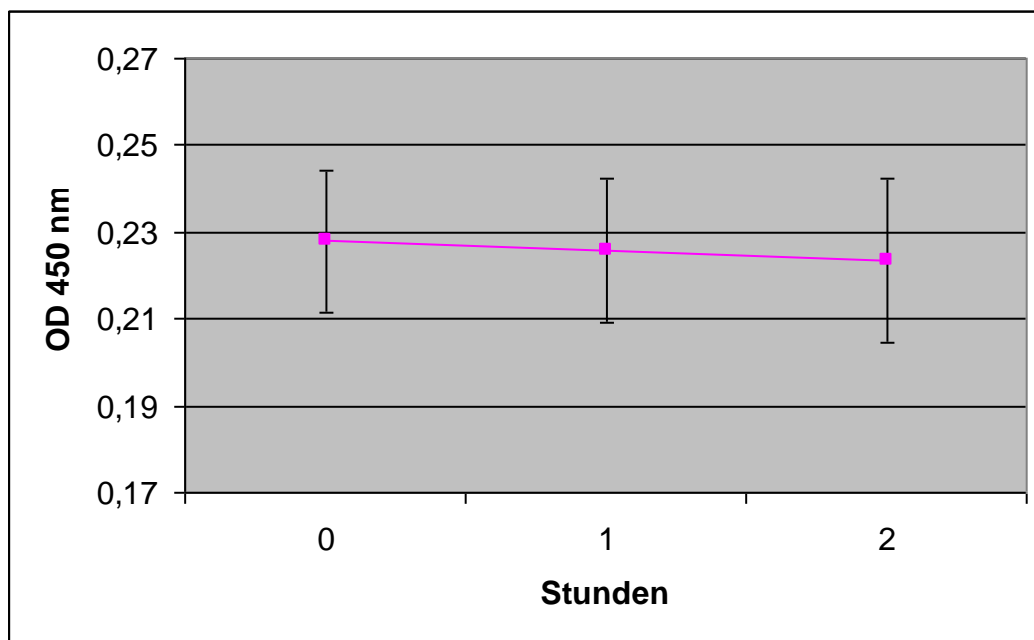


**Abb.3** : Adhärenz vitaler Chondrozyten nach 1, 2 und 3 h Inkubationszeit mit WST-1: 50.000 Zellen wurden über 24h in serumfreiem Medium auf unbeschichtetem PE kultiviert und danach die Vitalität der adhärenenten Zellen nach 1h, 2h und 3h Inkubation mit WST-1-Reagenz bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SD aus n=7 Messungen.

Da zwischen dem Reaktionsende und der tatsächlichen Messung der Extinktion stets einige Minuten vergingen, wurde die Stabilität des Reaktionsproduktes über einen Zeitraum von zwei Stunden verfolgt. Nach zwei Stunden Inkubation der Zellen mit WST-1 wurde die Absorption

bei 450 nm gemessen und danach die Lösung (ohne Zellen) für eine bzw. zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur stengelassen und erneut die Absorption bestimmt.

Das lösliche Formazanprodukt erwies sich im Versuch als außerordentlich stabil, mit einer Abnahme des OD-Wertes von nur 2% über zwei Stunden (Abb.4). Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die kurze Zeit zwischen Reaktionsende und Messung konnte daher ausgeschlossen werden.

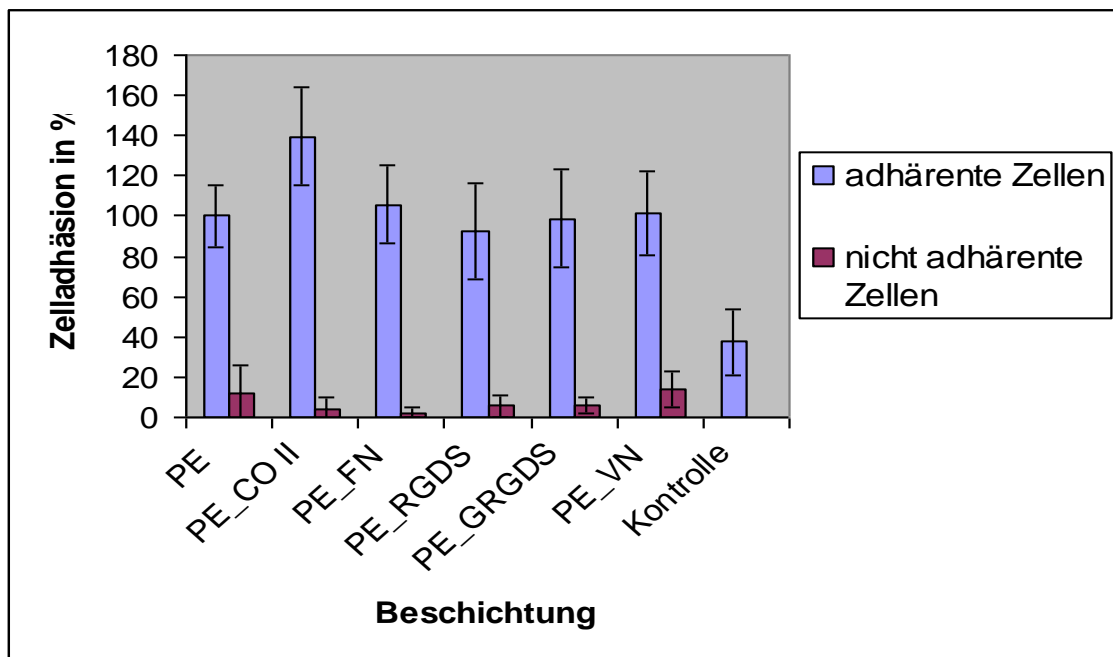


**Abb.4:** Stabilität der Extinktionswerte des WST-1-Lösungsproduktes über zwei Stunden: Nach Kultivierung von 50.000 Zellen in den Wells von Kulturschalen über 24h wurde die Vitalität der an den Wells adhärenen Zellen nach zweistündiger Inkubation mit WST-1 Lösung (1:10 verdünnt in RPMI-Medium+12% FKS) gemessen (Zeitpunkt 0). Anschließend wurde die Reaktionslösung erneut nach 1h (Zeitpunkt 1) bzw. 2h (Zeitpunkt 2) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von n=7 Messungen.

#### **4.2.2 Einfluss der ECM-Beschichtungen auf die Zelladhäsion**

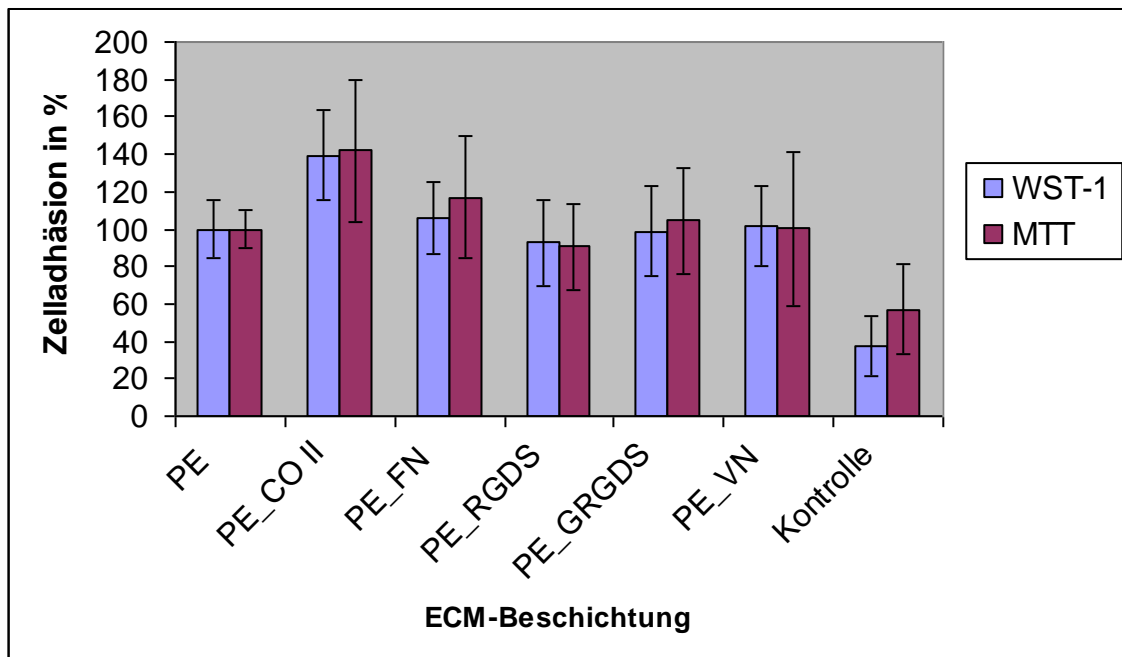
Aufgrund der Porosität des Biomaterials war davon auszugehen, dass ein Teil der Zellen nicht an PE sondern an der Kulturschale adhärenen würde. Zur Abschätzung der Menge dieser durchgefallenen Zellen wurden die Chondrozyten auf PE (*adhärenen Zellen*) und die an der Kulturschale adhärenen Zellen (*nicht adhärenen Zellen*) mittels WST-1-Assay getrennt voneinander bestimmt. Es zeigte sich, dass die Menge an durchgefallenen Zellen im Verhältnis zu den an PE adhärenen vernachlässigbar klein war (Abb.5). In folgenden Abbildungen wurde daher auf die Darstellung dieser Zellen verzichtet.





**Abb.5:** Adhärenente und nicht adhärenente Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium und Messung mit WST-1-Assay. *PE* bezeichnet die unbeschichteten Polyethylen-Proben. *PE\_CO II*, *PE\_FN*, *PE\_RGDS*, *PE\_GRGDS*, *PE\_VN*: PE-Proben mit entsprechender ECM-Beschichtung. Als *Kontrolle* dienten die in gleicher Menge direkt in die Kulturschale eingesetzten Zellen. Der Mittelwert der gemessenen Extinktionswerte von *PE* (n=12) wurde gleich 100% gesetzt und die Mittelwerte±SD der Extinktionswerte der anderen Proben bzw. der *Kontrolle* jeweils im prozentualen Verhältnis dazu angegeben.

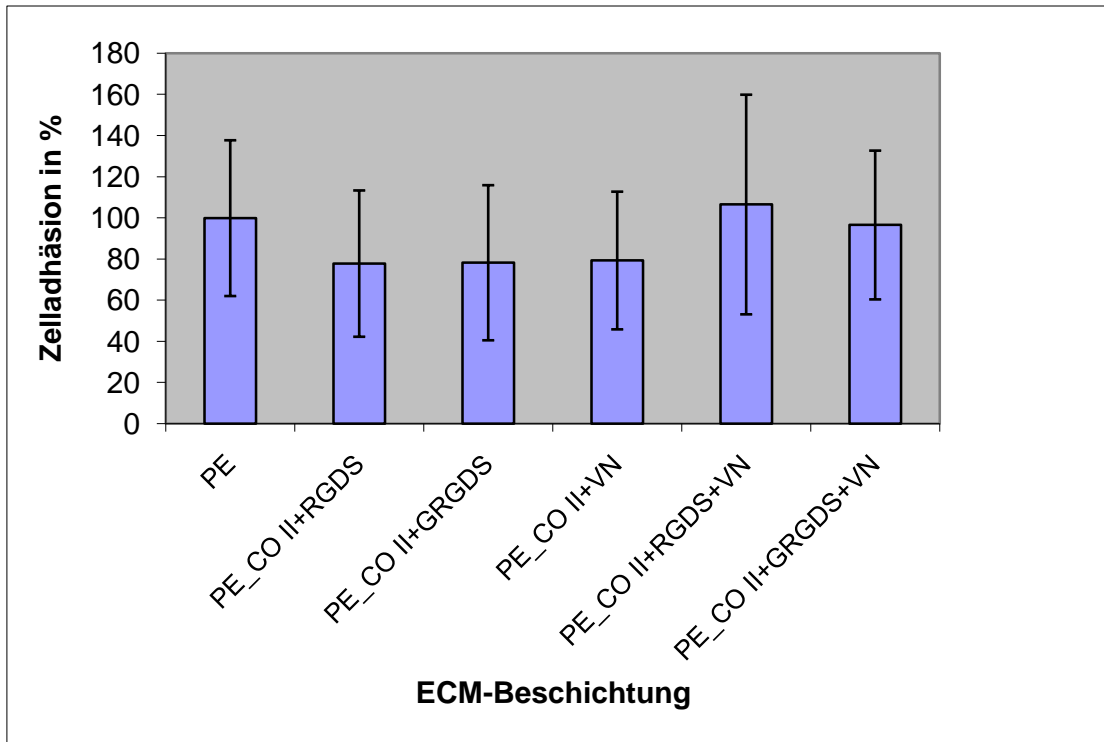
Beim Vergleich der PE-Proben untereinander zeigten sich, bei Verwendung des WST-1-Assays, zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in der Anzahl der adhärenenten Chondrozyten ( $F(6,69) = 20,33$ ,  $p < 0,001$ ). Es zeigte sich eine Steigerung der Anzahl adhärenenten Chondrozyten bei Beschichtung der Oberflächen mit Kollagen II (*PE\_CO II*), Fibronektin (*PE\_FN*) sowie, nur minimal, Vitronektin (*PE\_VN*) im Vergleich zu unbeschichtetem PE (*PE*). Der Unterschied war aber nur bei *PE\_CO II* signifikant ( $p < 0,001$ ). Auch im Vergleich mit den Proben mit anderer Beschichtung war die Menge der Zellen auf *PE\_CO II* signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höher. Für die als *Kontrolle* in gleicher Menge in die Kulturschale eingesetzten Zellen (*Kontrolle*) wurde eine signifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigere Adhärenenz als auf allen PE-Proben bestimmt (Abb.6).



**Abb.6:** Adhärenente Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium und Messung mit WST-1-Assay (blau) und MTT-Assay (rot). Der Mittelwert der gemessenen Extinktionswerte von *PE* (n=12) wurde gleich 100% gesetzt und die Mittelwerte±SD der Extinktionswerte der anderen Proben bzw. der Kontrolle jeweils im prozentualen Verhältnis dazu angegeben. Statistische Unterschiede sind im Text angegeben.

Die Durchführung des gleichen Versuchs mit dem MTT-Assay ergab ebenfalls signifikante Unterschiede ( $F(6,60) = 4,57, p \leq 0,001$ ), mit deutlicher Steigerung der Adhäsionsraten durch *PE\_CO II* gegenüber nativem *PE* ( $p < 0,05$ ). Weitere signifikante Unterschiede fanden sich zwischen *PE\_CO II* und *PE\_RGDS* ( $p < 0,05$ ), sowie zwischen der *Kontrolle* und *PE\_CO II* ( $p < 0,001$ ) bzw. *PE\_FN* ( $p < 0,05$ ) (Abb.6).

Mit dem Ziel die Anzahl adhärenenter Chondrozyten weiter zu steigern wurde neben der Untersuchung des Einflusses der einzelnen ECM-Moleküle auch der Effekt der Kombination von zwei bis drei der oben angegebenen Moleküle bestimmt. Die gleichzeitige Kopplung von Kollagen II mit einem oder zwei weiteren Peptiden an die Polyethylenoberflächen ergab in allen Messungen keine signifikante Erhöhung der Anzahl adhärenenter vitaler Zellen im Vergleich zu nativen Proben ( $F(5,65) = 1,12, p > 0,05$ ). Entgegen den Erwartungen scheint die Kombination die Zelladhäsion meist eher negativ zu beeinflussen. Eine leicht erhöhte Adhäsion wurde nur bei *PE\_CO II+RGDS+VN* gemessen (Abb.7).



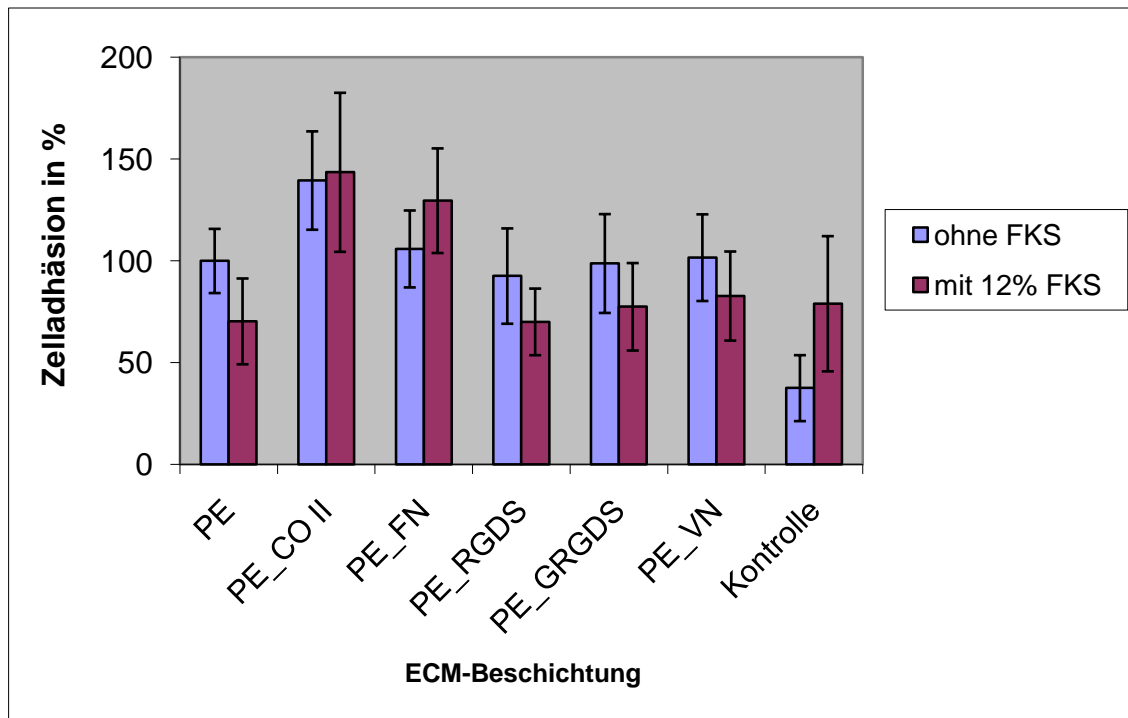
**Abb.7:** Adhärenz Zellen auf PE-Oberflächen mit mehreren immobilisierten ECM-Molekülen: Kollagen II, RGDS, GRGDS und Vitronektin wurden in den gleichen Konzentrationen wie in den vorhergehenden Versuchen gemischt und an die PE-Proben adsorbiert. Messung der Zelladhäsion nach Kultivierung von 50.000 Chondrozyten über 24 h auf den Proben in serumfreiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n=12.

### 4.3 Einfluss des Zusatzes von FKS zum Inkubationsmedium

Um den Einfluss des Zusatzes von 12% FKS zum Medium zu untersuchen, wurden die gemessenen Zelladhäsionsraten von Chondrozyten auf PE-Proben, die in Medium mit und ohne FKS kultiviert worden waren, direkt miteinander verglichen. Dafür wurde der OD-Wert der Messung der Zelladhäsion auf unbeschichtetem PE in serumfreiem Medium gleich 100% gesetzt und die Werte der anderen Proben im Verhältnis dazu angegeben.

In Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation wurden widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Insgesamt konnte durch den FKS-Zusatz kein positiver Effekt beobachtet werden ( $F(1,137) = 0,65, p > 0,05$ ).

Der Zusatz von FKS ergab in den Messungen einen Vorteil in den Adhäsionsraten für *PE\_FN* ( $p \leq 0,05$ ). Auf *PE* ( $p \leq 0,001$ ), *PE\_RGDS* ( $p \leq 0,05$ ), *PE\_GRGDS* ( $p \leq 0,05$ ) und *PE\_VN* (nicht signifikanter Unterschied) waren dagegen weniger adhärenz Zellen als in der Vergleichsgruppe zu finden. Die Anzahl der Zellen, die am Boden der Kulturschale adhärten, war doppelt so hoch, wenn FKS zugesetzt wurde ( $p \leq 0,01$ ), (Abb. 8).



**Abb. 8:** Vergleich der Adhärenz vitaler Chondrozyten bei Kultivierung in serumfreiem (ohne FKS) und serumhaltigem (mit 12% FKS) Medium. Die Prozentwerte sind bezogen auf den Mittelwert der Extinktionswerte, die bei PE ohne FKS gemessen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n=7 Messungen. Statistische Unterschiede sind im Text angegeben.

#### **4.4 Charakterisierung der Hybridsysteme durch immunhistochemischen Nachweis der ECM-Expression**

Zur Untersuchung des Verhaltens von Chondrozyten auf den ECM-beschichteten PE-Oberflächen im Verlauf längerer Kultivierung wurden mehrere Proben nach Besiedelung mit Chondrozyten über verschiedene Zeiträume in Knorpelmedium kultiviert und danach immunhistochemisch auf die Expression der ECM-Moleküle Kollagen I, Kollagen II, Fibronectin, Tenascin, Elastin, Vitronectin und Integrin  $\beta$ 1 untersucht.

Proben mit CO II-, FN-, RGDS-, GRGDS-, und VN-Beschichtung wurden über 5, 12 sowie 30 Tage kultiviert, darüber hinaus Proben mit CO II-, FN-, GRGDS-, und VN-Beschichtung auch über 3 bzw. 5 Monate. Die auf diese Proben ausgesäte Zellzahl betrug jeweils 1 Million.

##### **4.4.1 Einfluss der ECM-Beschichtung der PE-Oberflächen**

Zu allen fünf Zeitpunkten der Auswertung war festzustellen, dass die Protein-Expression der Chondrozyten unabhängig von deren Bindung an ein spezifisches ECM-Molekül auf der PE-Oberfläche war. Die Stärke der Expression eines ECM-Moleküls zeigte im Vergleich der

verschieden beschichteten Proben nur sehr geringe Schwankungen. Ein Beispiel zeigt Tab.3: Nach zwölf Tagen Kultivierung der Proben war die Stärke der Expression eines jeweiligen ECM-Moleküls bis auf geringe Schwankungen gleich, unabhängig von der Beschichtung der PE-Oberfläche, an die die Zellen adhärten. Die Abbildung 9 auf den folgenden zwei Seiten zeigt die geringen Unterschiede in der ECM-Expression von Chondrozyten auf *PE\_CO II* bzw. *PE\_FN* nach 1 Monat Kultivierung.

### Expression verschiedener ECM-Moleküle durch Chondrozyten auf PE

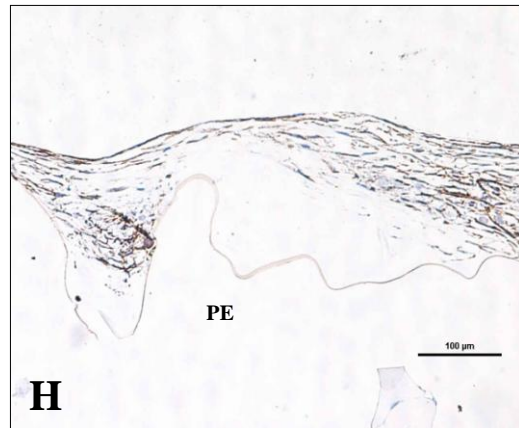
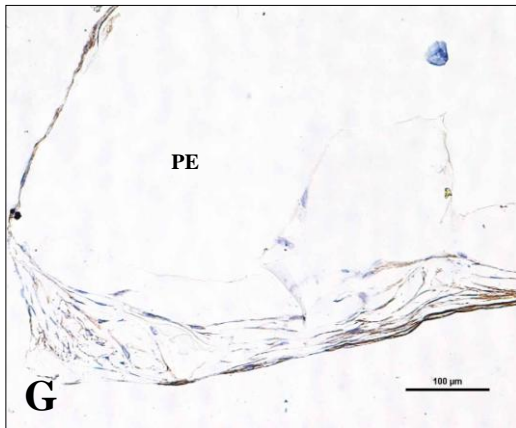
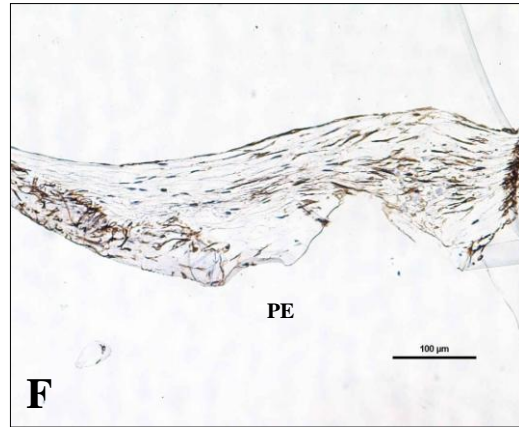
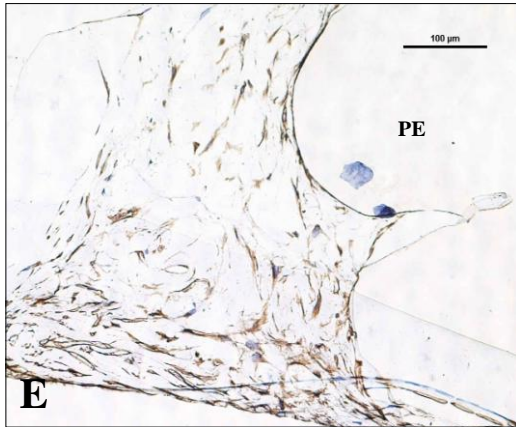
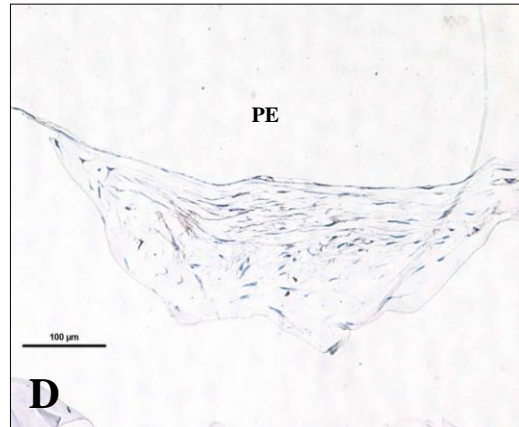
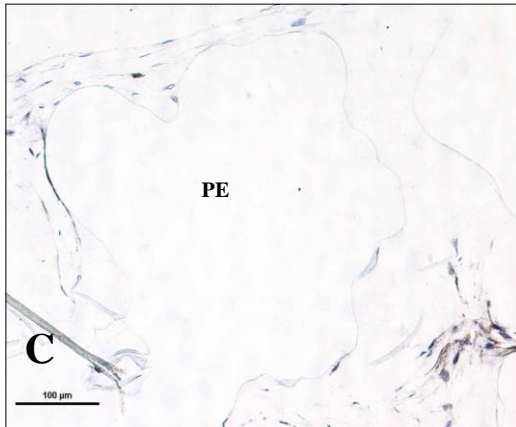
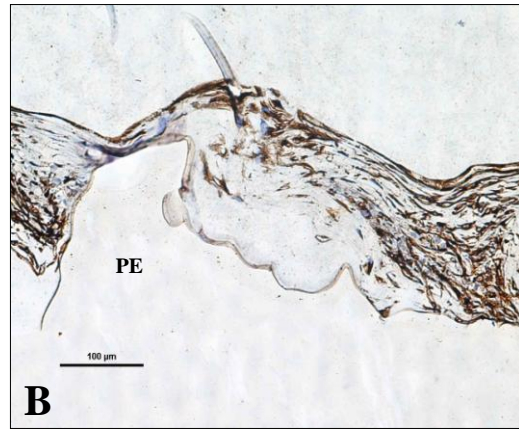
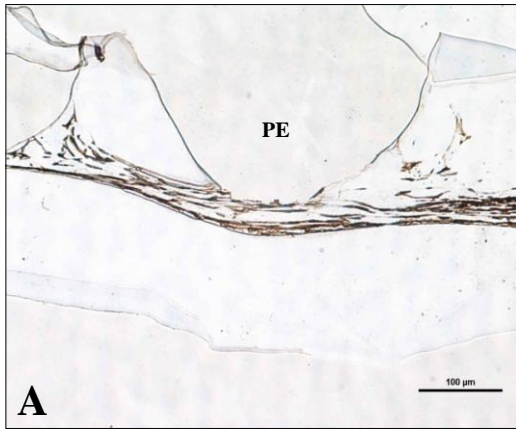
**Tab.3:** Stärke der Expression der ECM-Moleküle Kollagen I und II, Fibronectin, Tenascin, Vitronectin, Integrin  $\beta 1$  und Elastin nach 12-tägiger Kultivierung der Zellen auf verschiedenen modifizierten PE-Oberflächen: Angegeben ist die Stärke der immunhistochemischen Anfärbung der entsprechenden Strukturen durch lichtmikroskopische Beurteilung.

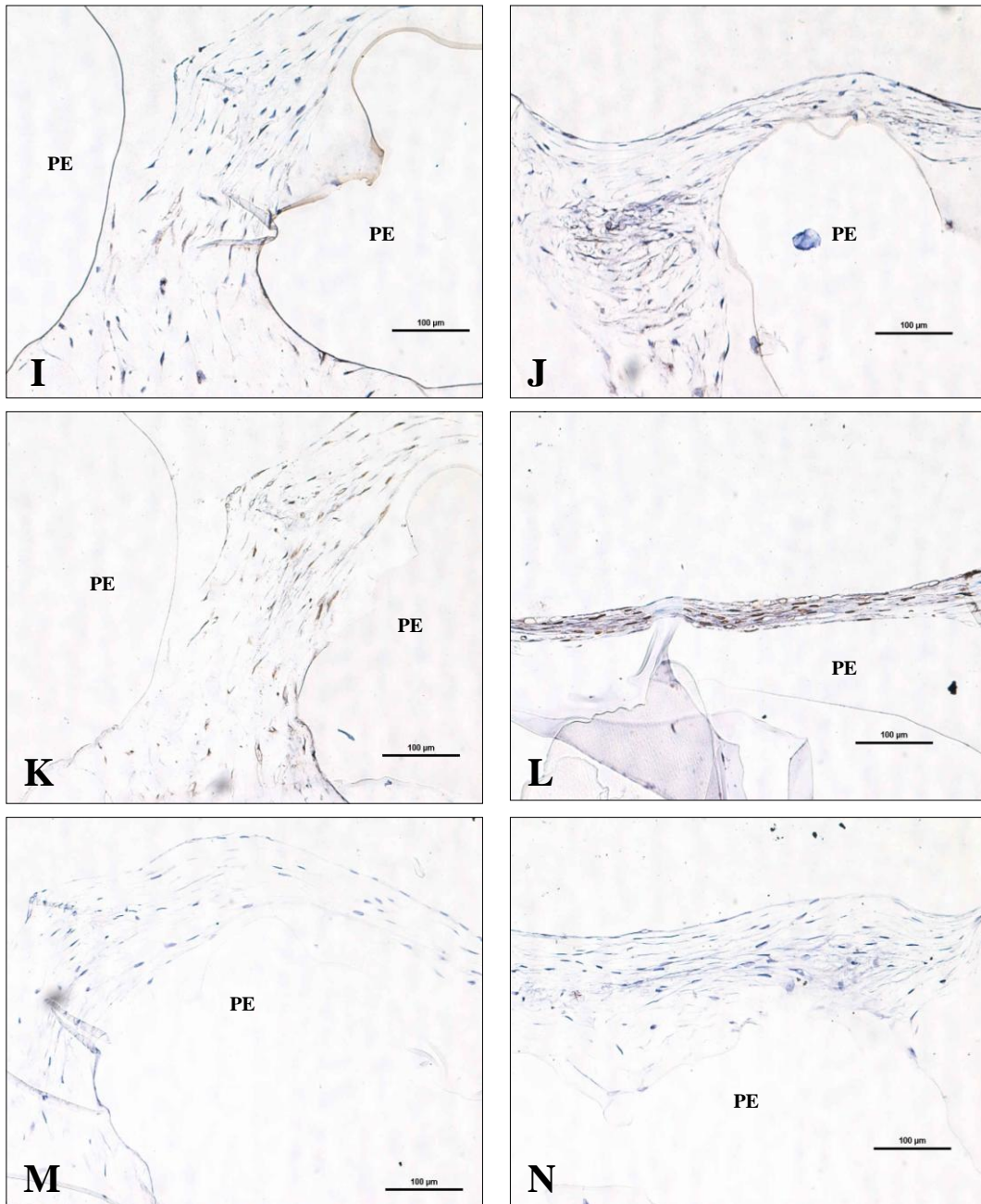
\*\*\*\* = sehr stark angefärbt, \*\*\* = stark angefärbt, \*\* = mäßig angefärbt, \* = schwach angefärbt, neg = keine Anfärbung

	<b>CO I</b>	<b>CO II</b>	<b>FN</b>	<b>TN</b>	<b>VN</b>	<b>Int <math>\beta 1</math></b>	<b>Elastin</b>
<b>PE</b>	****	**	****	****	*	**	Neg
<b>PE_CO II</b>	****	**	****	****	*	**	Neg
<b>PE_FN</b>	****	**	****	***	*	**	Neg
<b>PE_RGDS</b>	****	**	****	****	*	**	Neg
<b>PE_GRGDS</b>	****	**	****	****	*	**	Neg
<b>PE_VN</b>	****	**	***	***	*	**	Neg

*PE\_CO II*

*PE\_FN*





**Abb.9:** A-N: Anfärbung von ECM-Komponenten auf PE-Oberflächen nach 1-monatiger Kultivierung von  $10^6$  Chondrozyten. Vergleich zwischen *PE\_CO II*-Oberflächen (linke Spalte, A,C,E,G,I,K,M) und *PE\_FN*-Oberflächen (rechte Spalte, B,D,F,H,J,L,N). A und B: CO I, C und D: CO II, E und F: FN, G und H: TN, I und J: VN, K und L: Int  $\beta$ 1, M und N: Elastin. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu$ m. Vergrößerung 20x.

Für die Bestimmung des Syntheseverhaltens der auf PE adhärenen Chondrozyten im Verlauf von 5 Monaten wurden die Zellen 5 Tage, 12 Tage, 1 Monat, 3 Monate und 5 Monate lang auf den PE-Oberflächen kultiviert und danach die ausgewählten ECM-Moleküle wie oben immunhistochemisch nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden mit der Bestimmung dieser Moleküle in Schnitten von nativem humanem Septumknorpel verglichen, um zu prüfen, ob zu einem bestimmten Zeitpunkt ein ähnliches Expressionsmuster vorlag.

Die Färbungen zeigen, dass die Expression des knorpelspezifischen Kollagen II bereits nach 5 Tagen Kultivierung im Vergleich zu nativem Knorpel abgenommen hatte und im Verlauf der Zeit noch weiter abfiel bis sie nach 5 Monaten nur noch sehr schwach nachweisbar war. Dagegen nahm die Expression von Kollagen I bereits zu Beginn (5 Tage) zu und blieb zu allen Zeitpunkten hoch und war dabei deutlich stärker als diejenige von Kollagen II.

Die Synthese von Fibronectin war zu Beginn im Vergleich zum Nativpräparat gesteigert, erhöhte sich von Tag 5 auf Tag 12 nochmals und blieb von da an unverändert hoch. Ein ähnliches Muster zeigte Tenascin, wobei es hier nach dem Maximum an Tag 12 wieder zu einer leichten Abnahme der Expression kam.

Keine oder kaum Veränderungen im Expressionsmuster zeigten dagegen Integrin  $\beta 1$  (stets mäßige Anfärbung) und Vitronectin (stets schwache Anfärbung), sowie Elastin, welches zu keinem Zeitpunkt nachweisbar war.

Dabei zeigte sich dieser Verlauf der Expressionsmuster, wie oben bereits erwähnt, gleichermaßen bei allen Proben, unabhängig von der Beschichtung mit ECM-Molekülen (Tab.4 und Abb.10-15).

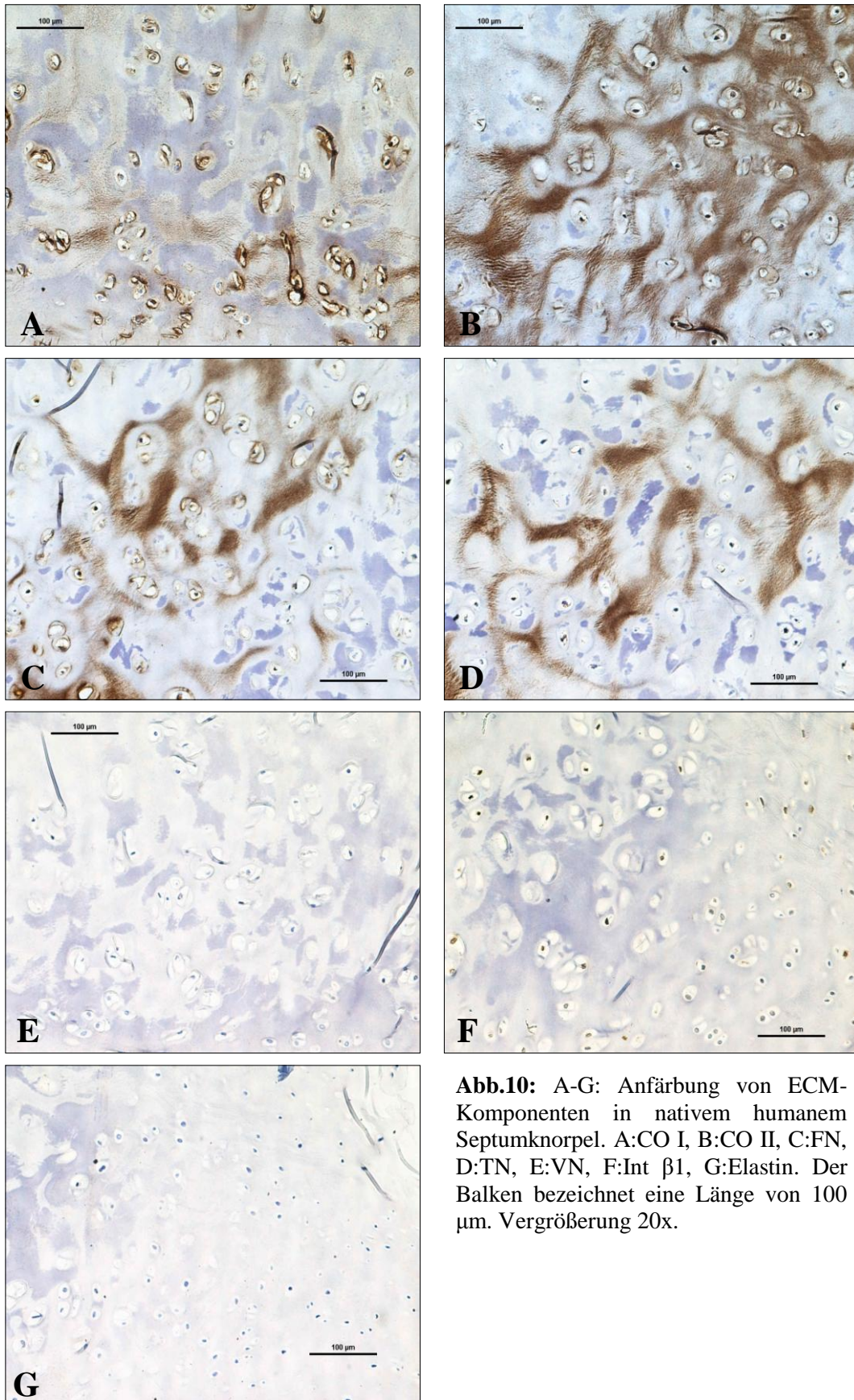
#### **Expression verschiedener ECM-Moleküle durch Chondrozyten auf PE nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten**

**Tab.4:** Expressionsmuster verschiedener ECM-Moleküle nach 5 Tagen, 12 Tagen, 1 Monat, 3 Monaten und 5 Monaten, sowie in nativem humanem Septumknorpel (*nativ*). Dieses Muster lag in gleicher Weise bei allen Proben (*PE, PE\_CO II, PE\_FN, PE\_RGDS, PE\_GRGDS, PE\_VN*) vor; Angegeben ist die Stärke der immunhistochemischen Anfärbung der entsprechenden Strukturen durch lichtmikroskopische Beurteilung. \*\*\*\* = sehr stark angefärbt, \*\*\* = stark angefärbt, \*\* = mäßig angefärbt, \* = schwach angefärbt, neg = keine Anfärbung

	<b>CO I</b>	<b>CO II</b>	<b>FN</b>	<b>TN</b>	<b>VN</b>	<b>Int <math>\beta 1</math></b>	<b>Elastin</b>
<b>nativ</b>	***	***	**	**	*	**	Neg
<b>5 Tage</b>	****	**	***	***	*	**	Neg
<b>12 Tage</b>	****	**	****	****	*	**	Neg
<b>1 Monat</b>	****	*	****	***	*	**	Neg
<b>3 Monate</b>	****	*	****	***	*	**	Neg
<b>5 Monate</b>	****	*	***	***	*	**	Neg

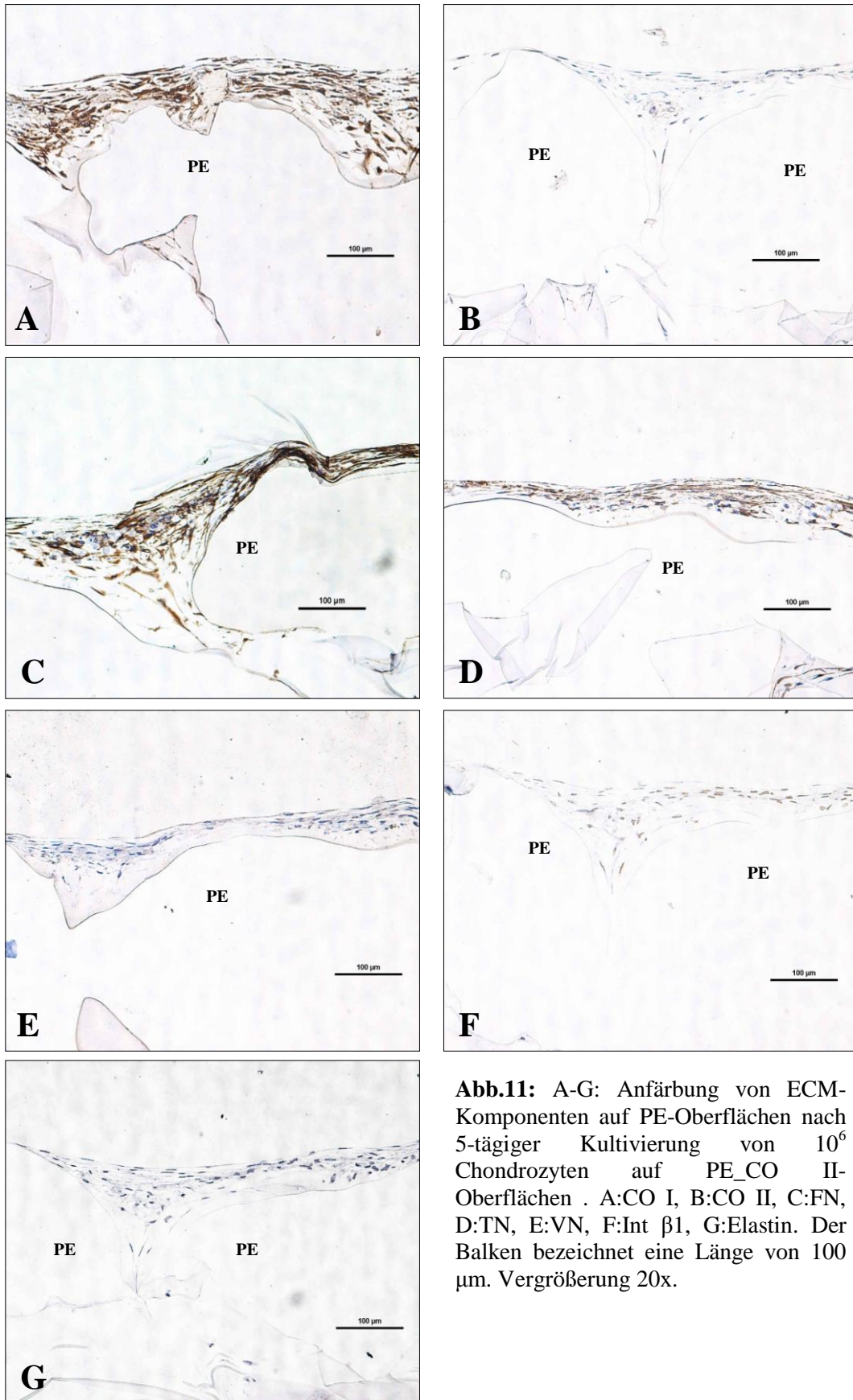


Septumknorpel nativ



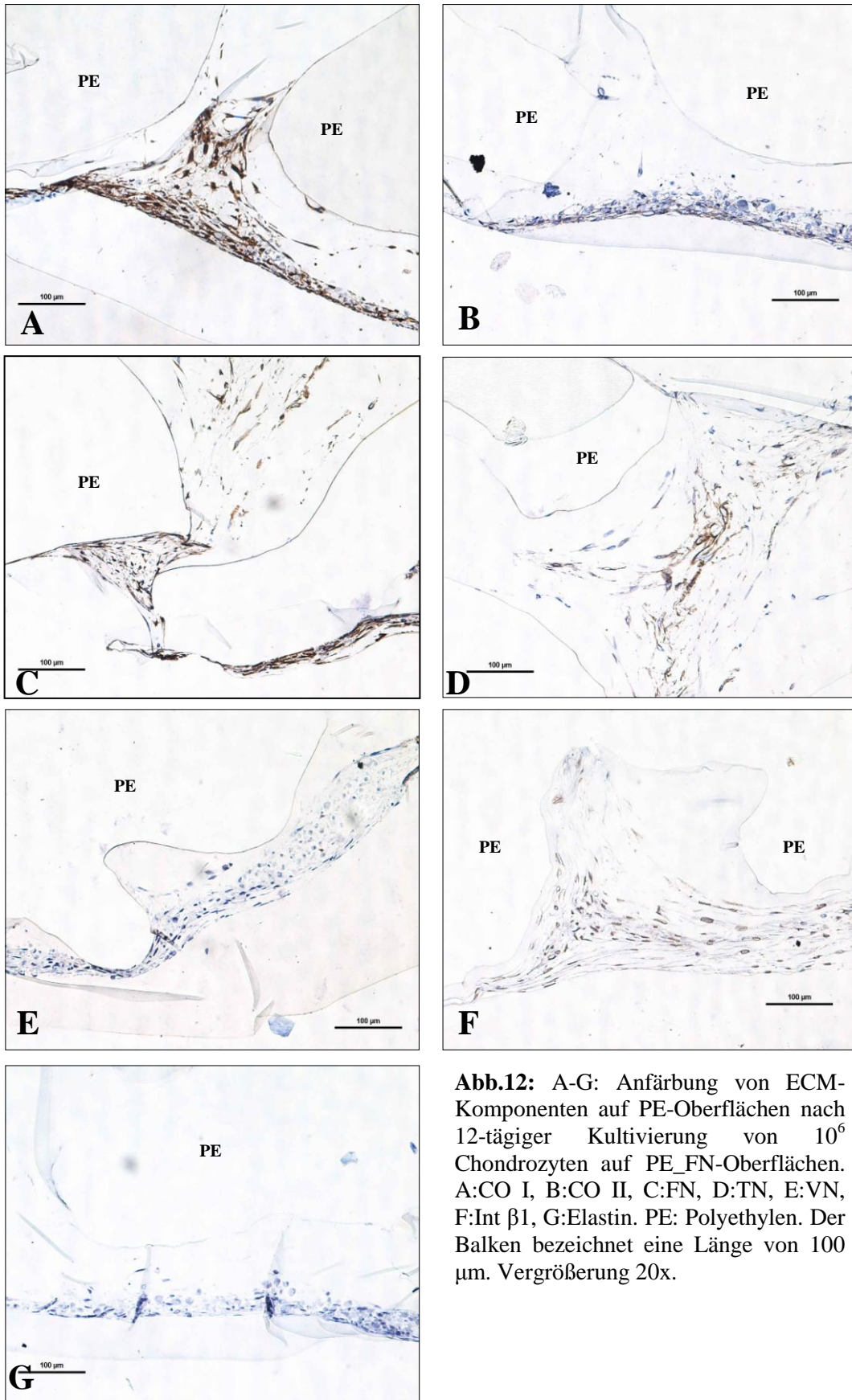
**Abb.10:** A-G: Anfärbung von ECM-Komponenten in nativem humanem Septumknorpel. A:CO I, B:CO II, C:FN, D:TN, E:VN, F:Int  $\beta 1$ , G:Elastin. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu\text{m}$ . Vergrößerung 20x.

**Chondrozyten auf PE - 5 Tage Kultivierung**



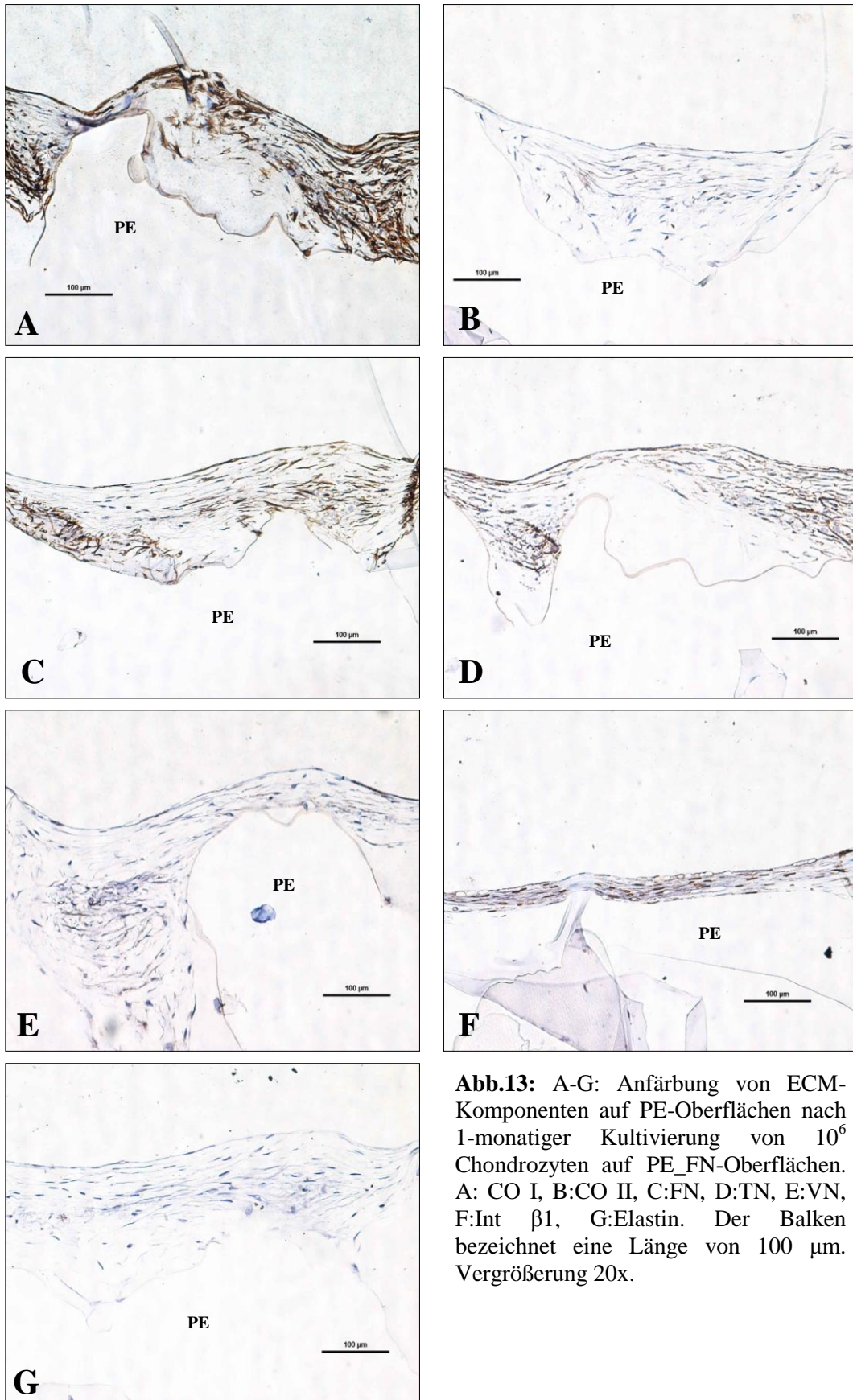
**Abb.11:** A-G: Anfärbung von ECM-Komponenten auf PE-Oberflächen nach 5-tägiger Kultivierung von  $10^6$  Chondrozyten auf PE\_CO II-Oberflächen . A:CO I, B:CO II, C:FN, D:TN, E:VN, F:Int  $\beta$ 1, G:Elastin. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu$ m. Vergrößerung 20x.

**Chondrozyten auf PE - 12 Tage Kultivierung**



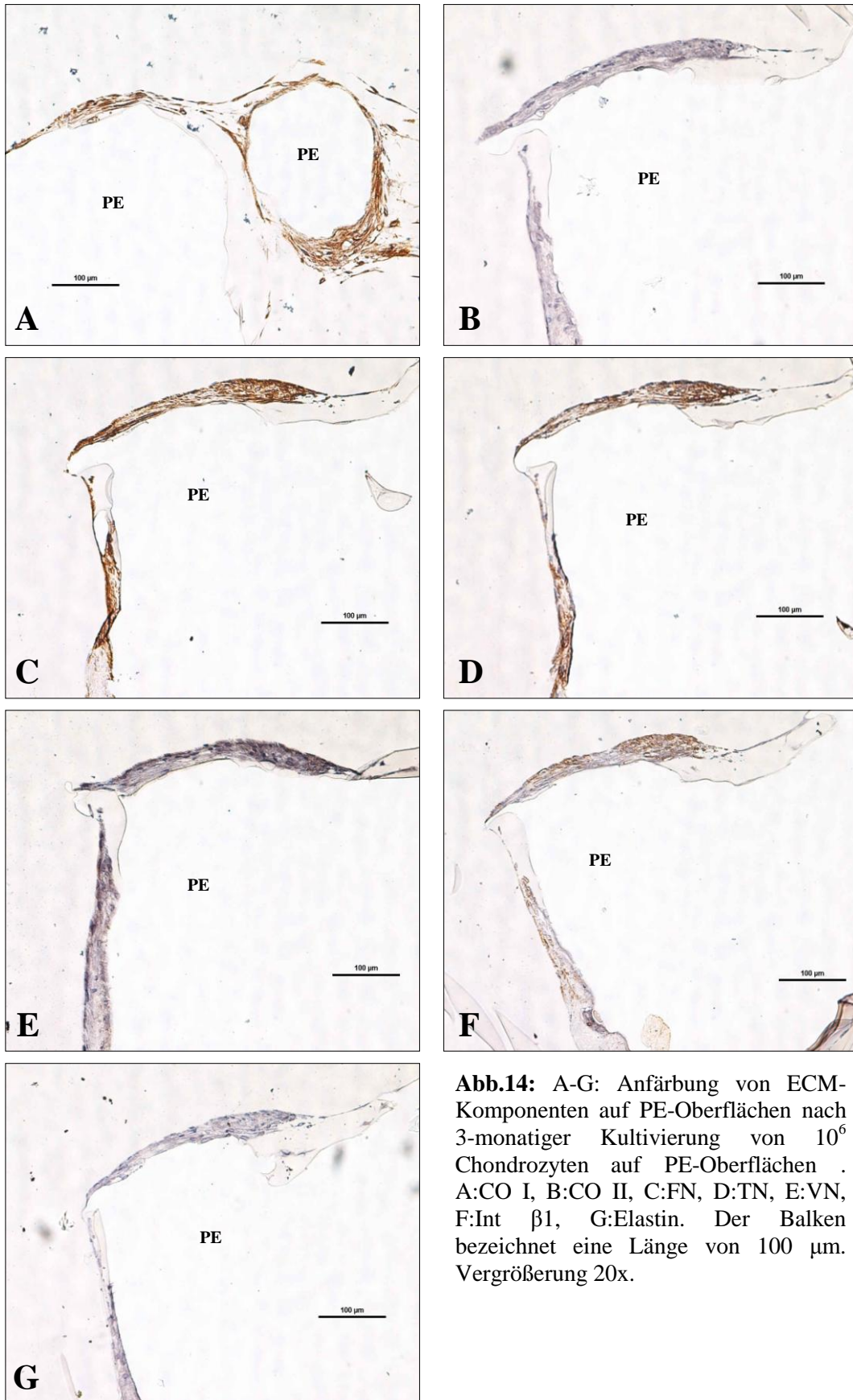
**Abb.12:** A-G: Anfärbung von ECM-Komponenten auf PE-Oberflächen nach 12-tägiger Kultivierung von  $10^6$  Chondrozyten auf PE\_FN-Oberflächen. A:CO I, B:CO II, C:FN, D:TN, E:VN, F:Int  $\beta$ 1, G:Elastin. PE: Polyethylen. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu$ m. Vergrößerung 20x.

**Chondrozyten auf PE – 1 Monat Kultivierung**



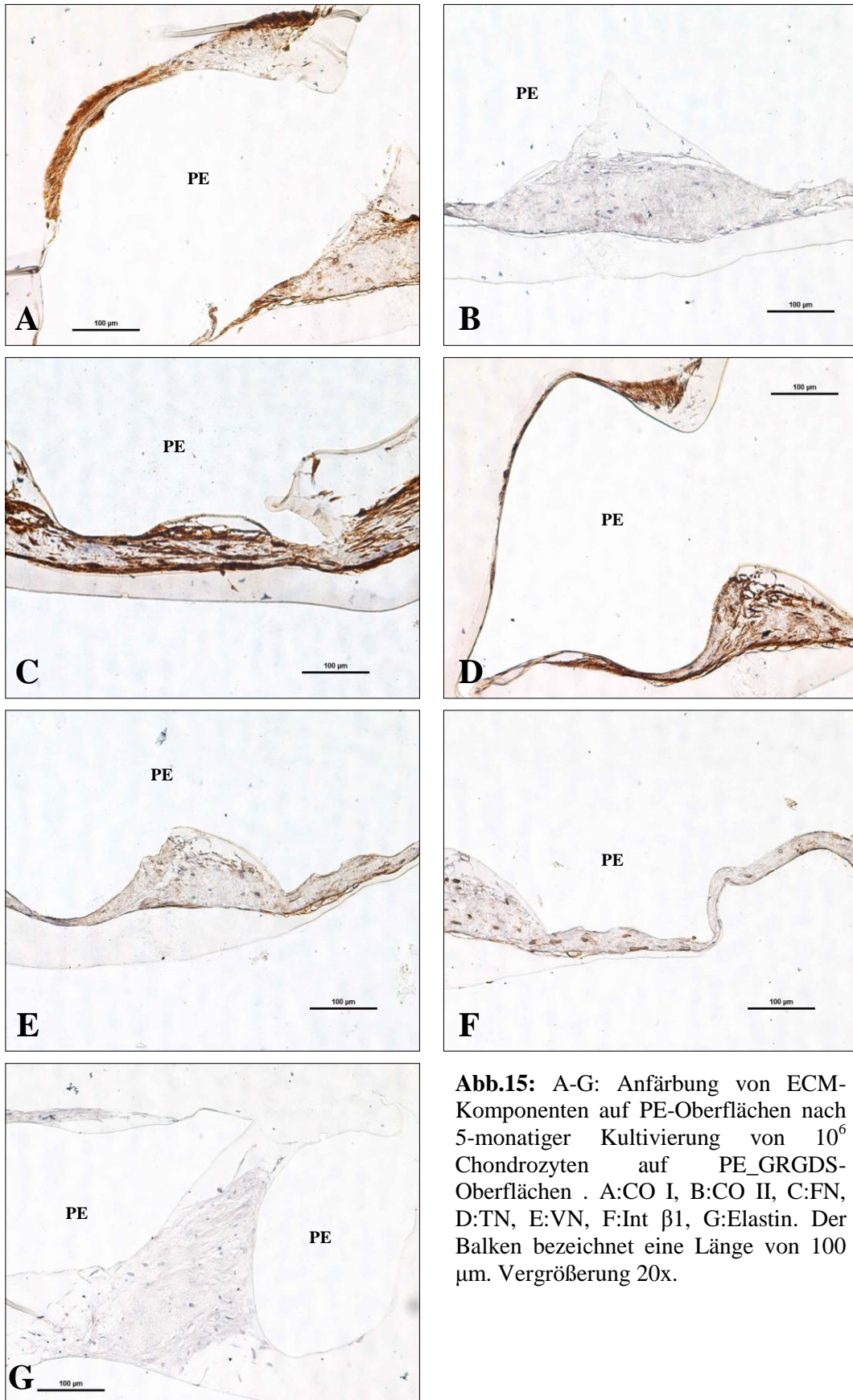
**Abb.13:** A-G: Anfärbung von ECM-Komponenten auf PE-Oberflächen nach 1-monatiger Kultivierung von  $10^6$  Chondrozyten auf PE\_FN-Oberflächen. A: CO I, B:CO II, C:FN, D:TN, E:VN, F:Int  $\beta$ 1, G:Elastin. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu$ m. Vergrößerung 20x.

Chondrozyten auf PE – 3 Monate Kultivierung



**Abb.14:** A-G: Anfärbung von ECM-Komponenten auf PE-Oberflächen nach 3-monatiger Kultivierung von  $10^6$  Chondrozyten auf PE-Oberflächen. A:CO I, B:CO II, C:FN, D:TN, E:VN, F:Int  $\beta$ 1, G:Elastin. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu$ m. Vergrößerung 20x.

Chondrozyten auf PE - 5 Monate Kultivierung



**Abb.15:** A-G: Anfärbung von ECM-Komponenten auf PE-Oberflächen nach 5-monatiger Kultivierung von  $10^6$  Chondrozyten auf PE\_GRGDS-Oberflächen . A:CO I, B:CO II, C:FN, D:TN, E:VN, F:Int  $\beta$ 1, G:Elastin. Der Balken bezeichnet eine Länge von 100  $\mu$ m. Vergrößerung 20x.

## **5 Diskussion**

In der Kopf-Hals-Chirurgie besteht aufgrund des geringen Heilungspotenzials von Knorpel ein ständiger Bedarf an Ersatzmaterialien bei der Rekonstruktion von kongenitalen, posttraumatischen oder postoperativen Defekten (Sclafani et al. 1997, Rotter et al. 2005). Die am häufigsten klinisch angewandte Methode zur Defektdeckung, die autologe Transplantation, hat den entscheidenden Nachteil der geringen Verfügbarkeit von körpereigenem Knorpelgewebe, so dass sich Probleme bei der Rekonstruktion größerer Defekte ergeben (Naumann et al. 2004, Rotter et al. 2005). Der alternative Einsatz von porösem Polyethylen als Implantatmaterial im Kopf-Hals-Bereich zeigt generell sehr gute Ergebnisse (Wellisz et al. 1993, Sclafani et al. 1997, Romo et al. 1998), allerdings besteht die Gefahr der Implantatabstoßung mit nachfolgender Infektion, besonders bei subkutaner Implantation (Wellisz 1993, Wellisz et al. 1993, Cenzi et al. 2005).

Seit einigen Jahren wird versucht, durch Tissue Engineering Knorpelgewebe aus körpereigenen Zellen und Biomaterialien in vitro herzustellen. Mit dieser Methode ließe sich autologes Ersatzmaterial in jeglicher Form ohne die Gefahr einer Infektionsübertragung erzeugen. Die Forschung ist auf diesem Gebiet bereits weit fortgeschritten, jedoch ist ein klinischer Einsatz bisher noch nicht möglich, was hauptsächlich durch mangelnde Stabilität und Resorption des Konstrukts in vivo bedingt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-resorbierbares Biomaterial aus hochverdichtetem porösen Polyethylen, Medpor<sup>®</sup>, auf seine Eignung als Matrix zum Tissue Engineering von Chondrozyten untersucht. Dabei war der Einfluss der Beschichtung dieses Materials mit Molekülen aus der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe auf die Adhäsion von primären Chondrozyten, sowie auf die Synthese von knorpelspezifischen ECM-Molekülen durch die Chondrozyten bei längerer Kultivierung besonders interessant. Letzteres ist hinweisend auf einen differenzierten bzw. dedifferenzierten Phänotyp der Zellen und damit entscheidend für die Fähigkeit zur Bildung von Knorpelgewebe (Benya und Shaffer 1982).

### **5.1 Einfluss von ECM-Molekülen auf die Zelladhäsion von Chondrozyten an PE-Oberflächen**

Eine Voraussetzung für das Tissue Engineering von Knorpel ist eine ausreichende Interaktion von Chondrozyten und Polymer. Eine häufig verwendete Methode zur Steigerung der Adhäsion von Zellen an Kunststoffoberflächen ist deren Beschichtung mit Adhäsionsmolekülen. Ein Beispiel aus der Praxis ist die Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Kollagen (Macklis et al. 1985). Da Chondrozyten ihre Differenzierung am besten in einer ihrer Matrix möglichst

ähnlichen Umgebung beibehalten, eignen sich dafür besonders Moleküle, die in der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe vorkommen.

In vorliegender Studie wurden zu diesem Zweck Kollagen II, Fibronectin und Vitronectin verwendet, da diese Proteine Bestandteile der Knorpelmatrix sind und dort über die Bindung an verschiedene Integrin-Subtypen die Adhäsion von Zellen vermitteln (Evans et al. 1983, Burton-Wurster et al. 1988, Enomoto et al. 1993, Loeser et al. 1995, Salter et al. 1995, Naumann et al. 2002). Darüber hinaus wurden auch zwei synthetische Peptide, RGDS und GRGDS verwendet, welche die Aminosäuresequenz RGD (Arg-Gly-Asp) enthalten, von der bekannt ist, dass sie die Integrin-Bindungsdomäne in verschiedenen ECM-Molekülen darstellt (Pierschbacher und Ruoslahti 1984, Rosso et al. 2004).

In zahlreichen Studien wurde bereits ein positiver Effekt der Kombination von resorbierbaren synthetischen Matrices und diesen Molekülen auf die Zelladhäsion nachgewiesen (Sittinger et al. 1994, 1996, Glass et al. 1996, Klee et al. 2003, Hu et al. 2003, Yoon et al. 2004, Lieb et al. 2005, Schleicher et al. 2005). Röpke et al. (2007) beobachteten eine erhöhte Zellzahl bei Beschichtung von nicht-resorbierbarem porösen Polyethylen (Medpor<sup>®</sup>) mit Kollagen I. Kinoshita et al. (1993, 1993a) konnten durch Kollagen I-Immobilisierung an die Oberflächen von porösem Polyethylen im Tierversuch eine verbesserte Integration des Biomaterials in das Gewebe, sowie eine Verringerung der Häufigkeit von Tumorbildung erreichen.

### **5.1.1 Diskussion der Methode zur Immobilisation von Proteinen**

Bei Materialien, die reaktive Gruppen auf ihrer Oberfläche besitzen, kann eine kovalente, und damit stabile Bindung der Proteine erreicht werden (Macklis et al. 1985). Einige Biomaterialien wie zum Beispiel Polyethylen besitzen jedoch keine solchen Gruppen und sind inert. Zur Lösung dieses Problems wurden in früheren Studien verschiedene Techniken zur Einführung funktioneller Gruppen an die Oberflächen angewendet, zum Beispiel Plasmabehandlungen mit oder ohne nachfolgende Propfpolymerisation von Acrylsäure und Vernetzung der Proteine mit wasserlöslichem Carbodiimid (Kinoshita et al. 1993a,b, Cheng und Teoh 2004, Ma et al. 2005, Röpke et al. 2007). Durch diese Funktionalisierung entstehen Carboxylgruppen, die mit den Aminogruppen der Proteine eine kovalente Bindung eingehen können.

Versuche von Röpke et al. (2007) zeigten jedoch einen eher negativen Effekt der Plasmabehandlung sowohl im Hinblick auf die Menge von gebundenem Kollagen als auch auf die Anzahl adhärenter Chondrozyten. Die besten Ergebnisse wurden erzielt wenn die Kollagenmoleküle mittels Carbodiimid vernetzt und adsorptiv auf der Oberfläche gebunden wurden. Zudem zeigten die Ergebnisse einer Studie von Woodfield et al. (2006) negative Auswirkungen der Gasplasma-Behandlung auf die Redifferenzierungskapazität von Chondrozyten nach Vermehrung in Monolayerkultur. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in



vorliegender Arbeit auf die Funktionalisierung der PE-Oberflächen verzichtet und die ECM-Moleküle nur unter Vernetzung mit Carbodiimid auf den Kunststoff adsorbiert.

Die erfolgreiche Durchführung der Methode wurde durch semiquantitative Bestimmung der Proteine auf den PE-Oberflächen mittels ELISA nachgewiesen. Mit der verwendeten Methode kann jedoch aufgrund einer fehlenden verlässlichen Eichkurve keine genaue Quantifizierung der Menge von gebundenem Protein vorgenommen werden. Die Eichkurven wurden erstellt, in dem definierte Proteinmengen (Collagen II bzw. Fibronectin) direkt an die Oberfläche der Zellkulturschale bzw. der PE-Proben adhärent gebunden wurden. Aufgrund der porösen Struktur des Materials war die Fläche der Zellkulturschale nicht mit der Oberfläche der PE-Probe vergleichbar. Die ermittelten Werte zeigten eine große Schwankungsbreite, weshalb auf die genaue Quantifizierung der gebundenen Proteine verzichtet wurde. Die Bindung der Proteine konnte jedoch sicher bestätigt werden, da sich deutlich höhere OD-Werte als auf unbeschichtetem PE ergaben (siehe Abb. 2).

Die für *PE\_FN* bestimmten höheren Extinktionswerte bedeuten nicht zwangsläufig, dass eine größere Menge Fibronectin auf den PE-Proben gebunden ist. Sie können auch in einer größeren Affinität des FN-Antikörpers zu seinem Antigen bzw. einer durch die Immobilisierung des Kollagen-II-Moleküls bedingten Konformationsänderung begründet sein. Die Konformationsänderung könnte zu einer Maskierung der Epitope geführt haben, die vom Antikörper erkannt werden.

### **5.1.2 Wahl der Messmethoden**

Um den Effekt der Beschichtung der PE-Oberflächen mit den Adhäsionsmolekülen zu untersuchen, wurde die Zelladhäsion auf den jeweiligen Proben gemessen und miteinander verglichen. Dazu wurden zwei Tests verwendet, die auf der Umsetzung der Tetrazoliumsalze MTT bzw. WST-1 zu Formazan durch das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase in vitalen Zellen basieren (Berridge et al. 1996). Der MTT-Assay ist ein sehr häufig verwendetes Testverfahren und wurde neben einer Vielzahl von anderen Zelltypen auch in Studien zur Vitalitätsbestimmung von Chondrozyten eingesetzt (Miller und McDevitt 1991, Sittinger et al. 1996, Cui et al. 2003, Walles et al. 2004, Ma et al. 2005, Röpke et al. 2007). Der Test ist zuverlässig, einfach durchzuführen und erlaubt die Beurteilung einer großen Anzahl von Proben in relativ kurzer Zeit.

Der WST-1-Test hat den Vorteil, dass das Tetrazoliumsalz hier zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert wird. Dies ist laut Ishiyama et al. (1996) der Grund für die extrem niedrige Zytotoxizität des Formazans während das unlösliche MTT-Reaktionsprodukt zellschädigend wirken kann. Außerdem konnte eine gute Korrelation zwischen Absorption und Anzahl der vitalen Zellen festgestellt werden (Ishiyama et al. 1993).

Aufgrund dieser Vorteile wurde in der vorliegenden Studie der WST-1-Assay zur Bestimmung der an den PE-Oberflächen adhärenen Chondrozyten verwendet, in einem Experiment jedoch zusätzlich zum Vergleich der MTT-Assay durchgeführt. Im Vergleich ergaben sich im MTT-Assay höhere Schwankungsbreiten der Absorptionswerte bei sonst vergleichbaren Ergebnissen (siehe Abb.6). Dies kann mit der Wasserunlöslichkeit des Formazanproduktes erklärt werden, welche einen zusätzlichen Arbeitsschritt nötig macht: Die nach Umsetzung von MTT entstandenen Formazankristalle müssen aufgelöst werden (in diesem Fall mit Propanol) und ergeben eine violett gefärbte Lösung. Da jedoch die PE-Proben durch Zusatz von Propanol nicht immer komplett entfärbt werden konnten, ist davon auszugehen dass in diesen Fällen das Formazan nicht aus allen Poren des Biomaterials herausgelöst werden konnte und somit der photometrischen Bestimmung entging. Beim WST-1-Assay ist dieser letzte Schritt aufgrund der Wasserlöslichkeit nicht nötig, stattdessen wird der Farbstoff kontinuierlich direkt an die Inkubationslösung abgegeben. Daher kann von einer größeren Genauigkeit dieser Methode ausgegangen werden. Eine weitere Ursache für die höheren Schwankungsbreiten ist auch die oben beschriebene Zytotoxizität des MTT-Reaktionsproduktes.

Da im Gegensatz zum MTT-Assay bisher wenige Daten zur Anwendung des WST-1-Assays bei Chondrozyten vorlagen, wurde, um die Testbedingungen zu optimieren, zunächst die optimale Inkubationszeit mit der Testsubstanz bestimmt. Diese wird vom Hersteller mit 0,5 bis 4 Stunden angegeben. In unserem Versuch hatte sich die Extinktion nach 2h gegenüber dem Wert nach einer Stunde verdoppelt, stieg aber in der nächsten Stunde wesentlich weniger an (siehe Abb.3). Aufgrund dessen wurde für die folgenden Assays die Inkubationszeit auf 2 Stunden festgesetzt. Carlson (2006) beobachtete bei der Durchführung des Versuches an humanen Fibroblasten einen linearen Anstieg der Extinktion bis zu 4 Stunden, schlägt jedoch ebenfalls 2 Stunden als Inkubationszeit vor. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von Zellen in der WST-1-Lösung über 5 Stunden keine Änderung der Absorption auftritt. Dies konnte in vorliegender Studie, zumindest über einen Zeitraum von 2 Stunden, bestätigt werden und zeigt die Stabilität des Reaktionsproduktes (siehe Abb.4).

### **5.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Adhäsionsassays**

Die getrennte Bestimmung von Zellen, die auf dem Biomaterial adhären und denen, die aufgrund der porösen Struktur hindurchgefallen waren, ergab eine im Verhältnis vernachlässigbar kleine Menge von letzteren Zellen (Abb.5). Die geringe Anzahl der nicht adhärenen Zellen zeigt eine höhere Affinität der Zellen zum PE. Die Zellmenge in den Kontrollwells nach 24-stündiger Inkubation war, trotz initial gleicher Zellzahl, deutlich niedriger als die auf PE-Oberflächen. Auch dies spricht für eine deutlich bessere Adhäsion an den PE-Oberflächen.

In unseren Untersuchungen war die Adhäsion der Chondrozyten an die PE-Oberflächen durch Kollagen II- Modifikation gegenüber den unmodifizierten Proben signifikant gesteigert (siehe Abb.6). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer Autoren in ähnlichen Studien (Sittinger et al. 1996, Tsai et al. 2002, Hsu et al. 2002, 2006, Röpke et al. 2007). Hsu et al. (2002) modifizierten poröse und dreidimensionale Matrices aus PLLA durch Vernetzung von Kollagen II mittels eines wasserlöslichen Carbodiimid und konnten dadurch eine zwei- bis vierfache Steigerung der Anzahl von Kaninchen-Chondrozyten nach 24 Stunden Inkubation im Vergleich mit unmodifiziertem PLLA erreichen. In einer ähnlichen Studie zeigten Sittinger et al. (1996) diesen Effekt von Kollagen II für die Adhäsion von humanen artikulären Chondrozyten an Polymerfaserstrukturen aus PLLA und PLGA. Röpke et al. (2007) verwendeten nicht-poröses Polyethylen und konnten dabei die Zelladhäsion durch Kollagen I-Beschichtung steigern.

Außer Kollagen II zeigte, bei Verwendung von serumfreiem Medium, auch die Immobilisation von FN und VN gegenüber den unbehandelten Proben einen positiven Effekt, der aber nur gering und nicht signifikant war. Bhati et al. (2001) untersuchten die Adhäsion von Chondrozyten in einem FN-beschichteten porösen Copolymer-Trägermaterial und fanden nach sieben Tagen Inkubation ebenfalls keine signifikante Erhöhung verglichen mit unbeschichtetem Material. Sie begründeten dieses Ergebnis damit, dass die meisten Zellen zunächst an den Boden der Petrischalen, in denen die Proben inkubiert worden waren, adhärten und somit nur mit der Unterseite des Materials in Kontakt kamen. Diese Erklärung kann für den Fall unserer Studie nicht herangezogen werden, da einerseits durch die getrennte Bestimmung der auf den Proben adhären und der nicht-adhären Zellen gezeigt wurde, dass nur ein geringer Teil der Zellen an den Boden der Kulturschalen angewachsen war, und andererseits dann auch der Effekt von Kollagen II hätte ausbleiben müssen. In der Mehrzahl der Studien wird im Gegensatz zu Bhati et al. ein positiver Einfluss der FN-Beschichtung beobachtet. Sommarin et al. (1989) sowie Schmal et al. (2006) zeigten in ähnlichen Versuchen, dass die Anzahl von Chondrozyten auf Zellkulturschalen durch FN noch mehr als durch Kollagen II gesteigert werden kann. Schmal et al. verwendeten zur Bestimmung der Zellzahlen ebenfalls einen Assay, bei dem ein Tetrazoliumsalz zu einem Formazanprodukt reduziert wird (MTS-Assay). Allerdings betrug die Kultivierungszeit der Zellen 10 Tage statt 24 Stunden, was die abweichenden Ergebnisse erklären kann. Nach 10 Tagen Kultivierungszeit ist nicht mehr von einem reinen Adhäsionseffekt auszugehen, sondern auch die Zellproliferation muss berücksichtigt werden. In der Studie von Sommarin et al. wurde dagegen für die Zelladhäsion nur eine Inkubationszeit von 1-2 Stunden gewählt. Möglicherweise ist der Adhäsionseffekt von Fibronectin in den ersten Stunden stärker ausgeprägt, wird jedoch im weiteren Verlauf von Kollagen II übertroffen. Die Arbeit von Schmal et al. (2006) gab Hinweise auf eine, mit höherer Anzahl der Passagierungen, zunehmende Affinität der Zellen zu FN mit gleichzeitig abnehmender CO II-Affinität. Unsere

Untersuchungen bestätigten diesen Zusammenhang nicht, obwohl ebenfalls Zellen aus der zweiten und dritten Passage verwendet wurden.

Auch die erfolgreiche Verwendung von RGD-Peptiden als Adhäsionsmoleküle wurde von zahlreichen Autoren berichtet (Jeschke et al. 2002, Hu et al. 2003, Lieb et al. 2005), darunter auch speziell die hier verwendeten Peptide RGDS (Schmedlen et al. 2002) und GRGDS (Drumheller und Hubbell 1994). In allen diesen Studien wurden die Peptide jedoch kovalent an die Materialoberflächen gebunden. Lieb et al. (2005) konnten dagegen zeigen, daß bei einer nicht-kovalenten Bindung von RGD-Peptiden die Zelladhäsion von Osteoblasten vermindert ist. Schleicher et al. (2005) untersuchten die Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten auf Oberflächen mit einfach adsorbiertem Vitronektin und wiesen auch hier eine Erhöhung im Vergleich zu Oberflächen ohne Vitronektin nach.

Die Ursachen für die geringen bzw. fehlenden Effekte von FN, VN und RGD-Peptiden in vorliegender Arbeit sind am ehesten in der räumlichen Orientierung dieser Proteine bzw. Peptide nach der Bindung an die PE-Oberflächen zu suchen. Damit eine Zellbindung zustande kommen kann, muss die RGD-Sequenz in den Molekülen für die Bindungsstellen auf den Integrin-Rezeptoren der Zellen zugänglich sein. Beer et al. (1992) fanden, dass eine Adhäsion von Thrombozyten an ein RGDF-Peptid nur dann stattfand, wenn mehrere Glycin-Reste an den Aminoterminus gekoppelt worden waren ((G)<sub>n</sub>-RGDF), während fast keine Interaktion mit G<sub>1</sub>-RGDF (d.h. nur ein Glycin-Rest am Aminoterminus) zu beobachten war. Daraus kann geschlossen werden, dass ein gewisser Abstand zwischen dem RGD-Peptid und der Oberfläche des Biomaterials notwendig ist, damit die Bindungsstelle des Integrin-Rezeptors erreicht werden kann. Dieser Abstand ist bei einem kurzen Peptid aus vier oder fünf Aminosäuren offenbar nicht immer gegeben. Es ist möglich, dass dies besonders bei einer unebenen Oberfläche mit Vertiefungen und Poren, wie im Falle von porösem PE, eine entscheidende Rolle spielt und kann unsere Beobachtungen erklären. Im Falle von FN und VN ist es möglich, dass viele der Proteine in einer Weise an die Oberflächen adsorbiert und vernetzt worden waren, dass die Zellbindungsdomänen für die Zellen nicht erreichbar waren, oder, dass die dreidimensionale Konformation so verändert wurde, dass die Affinität zu den Integrin-Rezeptoren vermindert war (Massia und Hubbell 1991). Vielleicht wäre eine kovalente Bindung der Peptide bzw. Proteine an eine funktionalisierte PE-Oberfläche besser geeignet als nur eine Vernetzung. Allerdings konnte in einer vorausgegangenen Studie (Röpke et al. 2007) gezeigt werden, dass eine kovalente Bindung an durch Gasplasma funktionalisierte Oberflächen ebenfalls keinen positiven Effekt hatte. Auf der Basis dieser Befunde war in der hier durchgeführten Studie auf die Funktionalisierung verzichtet worden.

Aus dem oben ausgeführten bleibt allerdings weiter unklar, warum die Kollagen II-Modifikation dagegen einen signifikant positiven Effekt hatte. Die Kollagen-Moleküle waren in gleicher Weise wie die anderen Adhäsionsproteine auf die Oberflächen aufgebracht worden,

also wäre eine Konformationsänderung mit Maskierung der Zellbindungsstellen hier ebenso gut möglich. Allerdings liegt Kollagen II in natürlichem Knorpelgewebe in weitaus größeren Mengen vor als die anderen ECM-Moleküle und ist knorpelspezifisch, so dass möglicherweise eine höhere Affinität der Integrin-Rezeptoren zu CO II vorliegt. Dies erscheint möglich, da bei der Interaktion zwischen Chondrozyten und CO II offenbar andere Mechanismen eine Rolle spielen als die Zellbindung an eine RGD-Sequenz wie bei FN und VN. Knight et al. (2000) identifizierten die Aminosäuresequenz GFOGER in Kollagen I und IV als hochaffine Bindungsstelle für die Integrine  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$ . Später konnten Zhang et al. (2003) zeigen, dass dieses Hexapeptid auch von  $\alpha_{11}\beta_1$ -Integrinen erkannt wird, welche von Chondrozyten exprimiert werden und eine besondere Affinität zu Kollagen II besitzen. Demnach kann es aufgrund der höheren Bindungsaffinität zu einer verstärkten Adhäsion der Chondrozyten an die CO II – modifizierten Oberflächen gekommen sein.

Aufgrund des positiven Effektes von Kollagen II auf die Zelladhäsion wurde versucht, diese durch Co-Immobilisierung von RGD-Peptiden und Vitronektin weiter zu steigern. In einer vorausgegangenen Untersuchung war bereits die Kombination von Kollagen II mit Fibronektin untersucht worden (Quint 2003). Dabei ließ sich aber kein positiver Effekt feststellen, weshalb jetzt auf eine erneute Durchführung dieser Kombination verzichtet wurde. In vorliegender Arbeit wurde stattdessen Kollagen II mit RGDS bzw. GRGDS und Vitronektin kombiniert. Es zeigte sich, dass Kollagen II plus ein weiteres Molekül (RGDS, GRGDS oder VN) zu einer geringeren Zelladhäsion als auf unmodifiziertem PE führte, während diese bei Kombination von drei Molekülen gleich (*PE\_CO II+GRGDS+VN*) bzw. leicht erhöht (*PE\_CO II+RGDS+VN*) war (siehe Abb.7). Eine negative Auswirkung der Verbindung von Kollagen II und RGD auf die Adhäsion von Chondrozyten fanden auch Hsu et al. (2006). Die Autoren beschichteten Kollagen II-Filme mit RGD-Peptid und stellten eine, nach 24 Stunden Inkubation, niedrigere Zelladhäsion als auf Filmen ohne RGD und unbeschichteten Kontrolloberflächen fest. Auch in unseren Versuchen war eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt worden. Möglicherweise waren die Zellbindungsstellen der Kollagenmoleküle durch die zusätzliche Vernetzung von RGD-Peptiden bzw. VN für die Zellen weniger zugänglich.

#### **5.1.4 Einfluss des Zusatzes von FKS zum Inkubationsmedium**

Fötale Kälberserum (FKS) ist einer der Hauptbestandteile vieler Nährmedien zur in vitro-Kultivierung von Zellen. Es enthält eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem Wachstumsfaktoren und adhäsive Proteine, welche die Anheftung der Zellen an die Kulturgefäße und deren Proliferation verbessern. Es wurde hier daher auch untersucht, ob der Zusatz von FKS zum Inkubationsmedium die Zelladhäsion an die PE-Oberflächen beeinflusst.

In Abbildung 8 ist der direkte Vergleich der Zelladhäsionsraten bei Inkubation in serumfreiem und serumhaltigem Medium dargestellt, indem alle Adhäsionsraten in prozentualem Verhältnis zu der Adhäsion auf unmodifiziertem PE in serumfreiem Medium (=100%) angegeben sind. Insgesamt war durch den FKS-Zusatz keine signifikante Erhöhung der Zelladhäsion zu erreichen. Es zeigte sich ein teils positiver (*PE\_FN*), teils aber auch negativer (*PE*, *PE\_RGDS*, *PE\_GRGDS*, *PE\_VN*) Effekt. Eine besonders deutliche Steigerung der Zelladhäsion durch Medium mit FKS konnte an der Oberfläche der Kulturwells (*Kontrolle*) beobachtet werden. Diese war hier doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe. In einer Studie zur Zytotoxizität von Blei fanden Dominguez et al. (2002), dass die, durch die toxische Wirkung des Metalls bedingte Ablösung der Zellen von Kulturgefäßen geringer war, wenn dem Medium höhere Konzentrationen von FKS zugesetzt waren. Die Autoren vermuten, dass die Zellen durch im Serum enthaltene Adhäsionsfaktoren wie Fibronectin und Kollagen stärker an die Oberflächen hafteten. Andere Untersuchungen identifizierten Vitronectin als das Hauptadhäsionsprotein in FKS (Hayman et al. 1985). Steele et al. (1993) wiesen eine hohe Adsorption, besonders von Vitronectin, aus Medium mit 10-15% FKS an Kulturgefäßoberflächen (tissue culture polystyrene, TCPS) nach. Die Menge des adsorbierten Proteins erwies sich dabei als ausreichend, um eine gute Adhäsion von verschiedenen Zellarten zu gewährleisten. Die deutlich höhere Anzahl von adhärierenden Zellen in den Kontrollwells in Anwesenheit von FKS ist mit diesen Ergebnissen gut vereinbar.

Im Serum befinden sich jedoch neben den adhäsiven Proteinen auch solche, welche die Zellanheftung an Oberflächen verhindern (Curtis und Forrester 1984). Es ist möglich, dass die negativen Effekte des FKS-Zusatzes durch die Bindung dieser Proteine an *PE*, *PE\_RGDS*, *PE\_GRGDS* und *PE\_VN* bedingt sind.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen**

Im weiteren Verlauf der Studie sollte untersucht werden, ob die Kombination von PE als Biomaterial mit immobilisierten ECM-Molekülen und Chondrozyten zum Tissue Engineering von Knorpel geeignet ist. In verschiedenen Körpergeweben gibt es eine Reihe von Proteinen, die spezifisch von den differenzierten Zellen dieser Gewebe synthetisiert werden. Sie sind daher geeignete Marker zur Beurteilung eines durch Tissue Engineering in vitro hergestellten Gewebes. Beispielsweise gibt beim Tissue Engineering von Knochen die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase Hinweise auf das Potenzial zur Knochenbildung (Yoon et al. 2004). Im Knorpelgewebe ist ein differenzierter Phänotyp der Chondrozyten hauptsächlich assoziiert mit der Synthese von Kollagen II, während Kollagen I in reifem Knorpel nicht gebildet wird. Dementsprechend ist die Synthese von Kollagen II durch kultivierte Knorpelzellen Voraussetzung für eine Knorpelneubildung in vitro. In der Literatur werden

verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Kollagen II- (und oftmals auch GAG-) Synthese von Chondrozyten angewendet, zum Beispiel der quantitative Nachweis mittels ELISA (Cui et al. 2003), kolorimetrische Verfahren (Donati et al. 2005), Bestimmung der Kollagen II - Genexpression mittels PCR (Darling und Athanasiou 2005) und Immunhistochemie (Homicz et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils  $10^6$  Zellen auf PE-Proben mit den oben erwähnten Beschichtungen (*PE*, *PE\_COII*, *PE\_FN*, *PE\_RGDS*, *PE\_GRGDS*, *PE\_VN*) über verschieden lange Zeiträume (5 Tage, 12 Tage, 1 Monat, 3 Monate, 5 Monate) kultiviert. Nach Ende der Kultivierungszeit wurden die Proben fixiert und immunhistochemisch auf die Expression von Kollagen I und II, Fibronectin, Vitronectin, Tenascin, Elastin und  $\beta$ 1-Integrin untersucht. Zum Vergleich wurden Schnitte von nativem humanem Septumknorpel auf die gleiche Weise gefärbt.

Vor der Durchführung der Versuche wurden die Knorpelzellen zunächst für zwei bis drei Passagen in Monolayerkultur vermehrt um eine ausreichende Anzahl von Zellen zu erhalten. Es ist bekannt, dass Chondrozyten unter diesen Bedingungen dedifferenzieren, also einen fibroblasten-ähnlichen Phänotyp annehmen und sich die ECM-Synthese von Kollagen II nach Kollagen I verlagert (Mayne et al. 1976). Nach Darling und Athanasiou (2005) treten diese Veränderungen auf der Stufe der Genexpression bereits nach der ersten Passage in hohem Maße auf. Es ist jedoch auch bekannt, dass die dedifferenzierten Chondrozyten durch nachfolgende Kultivierung in einer dreidimensionalen Umgebung ihren natürlichen Phänotyp wieder erlangen können (Benya und Shaffer 1982). Wir gingen davon aus, daß poröses Polyethylen aufgrund seiner porösen Struktur den Zellen eine solche dreidimensionale Umgebung gewährleistet und damit die Redifferenzierung fördert. Unsere Beobachtungen der ECM-Expression über die Zeit zeigten jedoch eine zunehmende Verringerung der Anfärbung von Kollagen II bei jederzeit starker Ausprägung von Kollagen I, was für einen dedifferenzierten Phänotyp der Zellen spricht. Es muß hier angemerkt werden, daß die starke Expression von Kollagen I auch in nativem humanem Septumknorpel beobachtet werden konnte, was im Widerspruch zu der geläufigen Meinung steht, dass dieser Kollagentyp in der Matrix von nativem Knorpel nicht vorliegt. Dies wurde in einer von Henderson et al. 2007 veröffentlichten Studie immunhistochemisch für nasalen Knorpel erneut gezeigt. Naumann et al. (2002) konnten dagegen zwar ebenfalls kein Kollagen I in nasaler Knorpelmatrix nachweisen, jedoch, überraschenderweise, eine deutliche Expression in der perizellulären Region.

Fibronectin ist in der ECM von nasalem Knorpel in geringen Mengen nachweisbar (Evans et al. 1983). Dies konnte in unserer Studie für humanen nasalen Knorpel bestätigt werden. In früheren Untersuchungen fanden Dessau et al. (1978) kein Fibronectin in der Matrix von Knorpel aus Hühnerembryonen, beobachteten jedoch die Aufnahme der FN-Synthese, nachdem die Chondrozyten enzymatisch aus dem Knorpelgewebe isoliert worden waren. Bei nachfolgender

Kultivierung der Zellen in Monolayerkultur kam es zu einer weiteren Steigerung, vor allem durch Chondrozyten, die gleichzeitig Kollagen I produzierten und einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp besaßen. Die in unseren Untersuchungen gefundene zunehmend starke Expression von FN weist damit zusätzlich zu dem beschriebenen Kollagen-Muster auf eine Dedifferenzierung der Zellen hin.

Tenascin ist ein Glykoprotein, das in der ECM von Bindegeweben enthalten ist. Es enthält mehrere FN Typ III-Domänen und bindet über eine RGD-Sequenz im dritten Repeat an die Integrine  $\alpha\beta3$  und  $\alpha8\beta1$  (Prieto et al. 1993, Schnapp et al. 1995). Der Subtyp Tenascin-C wird von reifen, differenzierten Chondrozyten exprimiert (Savarese et al. 1996). Pacifici et al. (1993) zeigten, dass im Zuge der Dedifferenzierung von Knorpelzellen in Monolayerkultur die Produktion von Tenascin eingestellt wird und schließen aus den weiteren Ergebnissen ihrer Studie, dass die Tenascin-C-Expression ein Charakteristikum von permanenten Chondrozyten ist. Der positive Nachweis von TN in nativem Septumknorpel in unserer Studie ist damit vereinbar. Jedoch ist die Steigerung der Expression bei Kultivierung der Zellen auf PE aufgrund dieser Ergebnisse unerwartet, da die Expressionsmuster der Kollagene und FN einen dedifferenzierten Phänotyp andeuten.

Vitronektin wird sowohl im Plasma als auch in der extrazellulären Matrix nachgewiesen. Auch in diesem Glykoprotein ist eine RGD-Sequenz für die Bindung an Integrine, hauptsächlich  $\alpha\beta3$ , verantwortlich. Es ist Bestandteil von normalem Knorpelgewebe (Salter et al. 1995). Goessler et al. (2006) konnten bei dedifferenzierenden Chondrozyten keine Expression des VN-Gens nachweisen, was auf eine Einstellung der VN-Synthese in diesem Zustand hinweist. In diesem Zusammenhang kann die in vorliegender Arbeit nur sehr schwach nachgewiesene VN-Expression als weiteres Zeichen eines dedifferenzierten Phänotyps der Zellen gewertet werden. Wie bereits mehrfach erwähnt, binden die Zellen über ihre membranständigen Integrin-Rezeptoren an die Moleküle der extrazellulären Matrix. Neben einer Reihe von verschiedenen  $\alpha$ -Ketten, konnte auf der Oberfläche von Chondrozyten die  $\beta1$ -Kette als entscheidend für die Zellbindung nachgewiesen werden (Dürr et al. 1993). Wir untersuchten daher neben den ECM-Molekülen auch die Expression von  $\beta1$ -Integrinen auf Chondrozyten in nativem Knorpel und nach Kultivierung auf PE und fanden eine stets gleichmäßige Expression trotz Veränderungen in der Expression der verschiedenen ECM-Moleküle. Dies ist damit zu begründen, dass alle diese Moleküle mit  $\beta1$ -Integrinen interagieren. Wenn zusätzlich die  $\alpha$ -Ketten untersucht worden wären, wäre wahrscheinlich besonders eine Steigerung der Expression von  $\alpha5$ , als Bestandteil des FN-Rezeptors  $\alpha5\beta1$ , zu beobachten gewesen.

Elastin ist ein Hauptbestandteil von elastischem Knorpel, der in der Ohrmuschel und der Epiglottis vorkommt. In hyalinem Knorpel, wie Nasenseptum, ist es nur in sehr geringen Mengen vorhanden. In unseren immunhistochemischen Untersuchungen konnte auf keinen Proben und zu keinem Zeitpunkt Elastin nachgewiesen werden. Die Charakterisierung von in



in vitro hergestelltem Knorpel durch Henderson et al. (2007) zeigt ein identisches Ergebnis. Naumann et al. (2002) zeigten ebenfalls nur eine minimale Anfärbung von Elastin perizellulär in Septumknorpel.

Zusammenfassend lässt sich aus dem Muster der Expression der Matrixmoleküle im Verlauf der Kultivierungszeit schließen, dass es bereits zu Beginn der Kultur zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten gekommen war, die im Verlauf weiter zunahm. Die Theorie, dass die Zellen durch die poröse Struktur des PE, verbunden mit der Oberflächenmodifikation durch ECM-Moleküle einen differenzierten Phänotyp ausbilden würden, wurde nicht bestätigt. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse einer Studie von LiVecchi et al. (1994), die eine Beibehaltung des differenzierten Phänotyps von Chondrozyten in porösen Polyethylenmatrices nachweisen konnten. Allerdings verwendeten die Autoren hier Zellen direkt nach der enzymatischen Isolierung aus Knorpelgewebe, ohne zusätzliche Vermehrung in Monolayerkultur. In einer immunhistochemischen Untersuchung von Knorpelzellen nach der 3. Passage in Monolayerkultur fanden wir ein ähnliches Muster der Expression von ECM-Molekülen wie bei den Zellen auf PE (Daten nicht gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass sich unsere Zellen nach der Vermehrung in einem dedifferenzierten Zustand befanden und nach der Überführung auf PE nicht wieder zu ihrem normalen Phänotyp zurückkehren konnten. Curran et al. (2005) zeigten in einer Arbeit mit mesenchymalen Stammzellen, dass bestimmte funktionelle Gruppen auf der Materialoberfläche die Differenzierung der Zellen in Richtung eines bestimmten Phänotyps lenken. So zeigten Zellen, die auf Oberflächen mit COOH-Gruppen kultiviert worden waren Hinweise auf eine chondrogene Differenzierung, während Kontakt mit NH<sub>2</sub>-Gruppen eher eine osteogene Differenzierung verursachte. Möglicherweise könnte somit auch die Redifferenzierung der Chondrozyten gefördert werden.

Es war auffällig, dass die Beschichtung der PE-Proben mit den verschiedenen ECM-Molekülen keinen Einfluss auf die Matrixsynthese der Chondrozyten hatte. Entgegen den Erwartungen war die ECM-Expression an den jeweiligen Zeitpunkten für alle Proben identisch. Diese Beobachtungen machten auch Brodtkin et al. (2004) für Knorpelzellen in Monolayer. Zellen, die auf Kollagen I -, Kollagen II – und Fibronectin-Substraten kultiviert worden waren, bildeten äquivalente Matrices aus und dedifferenzierten. Die Autoren vermuten, dass die Interaktion mit der neugebildeten Matrix, besonders mit Fibronectin über  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, das Zellverhalten unabhängig von dem Substrat beeinflusste. Pennypacker et al. (1979) zeigten, dass die Zellen als Folge einer solchen Interaktion mit Fibronectin Merkmale einer Dedifferenzierung ausbilden und wiesen darauf hin, dass in manchen Fällen bereits die in Medium mit 10% FKS enthaltene FN-Menge diese Veränderungen auslösen kann. Brodtkin et al. betonten zwar, dass ihre Beobachtungen bei Zellen in Monolayer gemacht wurden und sich daraus keine Schlüsse auf

das Verhalten in 3-D-Matrices ziehen ließen, jedoch wäre es durchaus möglich, dass in unserem Fall ähnliche Mechanismen abgelaufen waren.

## **6 Zusammenfassung**

Hyaliner Knorpel besitzt nach Zerstörung ein geringes Heilungspotential. In der Kopf-Hals-Chirurgie besteht daher im Rahmen von rekonstruktiven Eingriffen ein großer Bedarf an Knorpel. Die derzeit angewendeten Methoden autologe Transplantation, allogene Transplantation und die Verwendung von alloplastischen Materialien weisen einige Nachteile wie geringe Verfügbarkeit und Gefahr von Infektionsübertragung und Abstoßungsreaktionen auf. Die in vitro-Herstellung von Knorpelgewebe aus autologen Zellen und Biomaterialien durch Tissue Engineering stellt eine vielversprechende Option für die Zukunft dar. Bis jetzt konnte jedoch durch die Kombination von Zellen und resorbierbaren Biomaterialien keine langfristige Formstabilität des Ersatzgewebes erreicht werden. In vorhergehenden Studien war die Eignung eines nicht-resorbierbaren Biomaterials aus porösem Polyethylen für das Tissue Engineering von Knorpel gezeigt worden.

Zur weiteren Optimierung des Biomaterials wurde in vorliegender Studie der Einfluss von Molekülen der extrazellulären Matrix auf die Adhäsion von Chondrozyten sowie auf die Entstehung von Knorpelgewebe untersucht. Verschiedene ECM-Moleküle wurden an poröses Polyethylen gebunden. Aus Septumknorpel enzymatisch isolierte Chondrozyten wurden danach über 24 Stunden auf diesen Proben kultiviert und schließlich die Zelladhäsionsraten auf den verschiedenen Proben bestimmt und mit unbehandeltem Polyethylen verglichen. Zudem wurden über längere Zeiträume auf ECM-beschichteten PE-Proben kultivierte Chondrozyten auf die Expression von knorpelspezifischen ECM-Molekülen untersucht.

Die Menge von adhärenenten Zellen konnte nur durch Immobilisierung von Kollagen II an das Biomaterial signifikant gesteigert werden. Der Zusatz von FKS zum Inkubationsmedium führte zu keiner signifikanten weiteren Verbesserung.

Die Beschichtung des Polyethylens mit ECM-Molekülen hatte im Vergleich zu unbeschichtetem Material jedoch keinen Einfluss auf die Synthese von ECM-Molekülen durch die kultivierten Chondrozyten. In allen Fällen zeigten sich im Verlauf Zeichen einer Dedifferenzierung der Chondrozyten und es kam nicht zur Ausbildung von knorpeligen Strukturen.

In dieser Arbeit konnte ein positiver Einfluss von bestimmten ECM-Molekülen, insbesondere Kollagen II, auf die Adhäsion von Chondrozyten an porösem Polyethylen nachgewiesen werden. Dies stellt eine Verbesserung des Biomaterials für das Tissue Engineering von Knorpel dar, da hierfür eine ausreichende Anzahl von adhärenenten Zellen benötigt wird.

Diese „kritische Menge“ an Chondrozyten auf und in der porösen PE-Probe scheint zur Förderung der Ausbildung nativer Knorpelstrukturen und zur Verhinderung einer fortschreitenden Dedifferenzierung der Chondrozyten erforderlich. In weiteren Studien sollte primär eine höhere Anzahl von Zellen verwendet werden, nach Schön et al. (2008) zwischen 5 und 10 Mio. Außerdem sollte es das Ziel sein, eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen auf

dem Implantatmaterial zu erreichen. Darüberhinaus sollten zum Vergleich resorbierbare Implantatmaterialien eingesetzt werden. Die Kultivierung der Hybridsysteme aus synthetischer Matrix und primären Chondrozyten in dieser Studie erfolgte unter statischen Kulturbedingungen. Der Einsatz von Perfusionskultursystemen bzw. Bioreaktoren wäre eine sinnvolle Alternative, da hierdurch eine bessere Versorgung der Zellen mit Nährstoffen möglich wäre. Dies würde möglicherweise die schnelle Dedifferenzierung der Zellen verhindern und somit die Fähigkeit zur Bildung von Knorpelgewebe verbessern.

## **7 Literaturverzeichnis**

1. Araco A, Gravante G, Araco F, Castri F, Delogu D, Filingeri V, Casciani CU, Cervelli V (2006) Autologous cartilage graft rhinoplasties. *Aesth Plast Surg* 30:169-174
2. Beer JH, Springer KT, Collier BS (1992) Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) Peptides of Varying Lengths as Structural Probes of the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor. *Blood* 79:117-128
3. Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215-224.
4. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4:14-19
5. Bhati RS, Mukherjee DP, McCarthy KJ, Rogers SH, Smith DF, Shalaby SW (2001) The growth of chondrocytes into a fibronectin-coated biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res* 56:72-82
6. 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
7. Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME (2004) Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 25:5929-5938
8. Burton-Wurster N, Horn VJ, Lust G (1988) Immunohistochemical Localization of Fibronectin and Chondronectin in Canine Articular Cartilage. *J Histochem Cytochem* 36:581-588
9. Carlson MA (2006) Technical Note: Assay of Cell Quantity in the Fibroblast-Populated Collagen Matrix with a Tetrazolium Reagent. *Eur Cell Mater* 12:44-48
10. Cameron TL, Belluoccio D, Farlie PG, Brachvogel B, Bateman JF (2009) Global comparative transcriptome analysis of cartilage formation in vivo. *BMC Dev Biol.* 9:20
11. Cenzi R, Farina A, Zuccarino L, Carinci F (2005) Clinical outcome of 285 Medpor grafts used for craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg* 16:526-530
12. Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Tateishi T (2003) Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Letters* 542:95-99
13. Cheng Z, Teoh SH (2004) Surface modification of ultra thin poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials* 25:1991-2001
14. Cui YL, Hou X, Qi AD, Wang XH, Wang H, Cai KY, Yin YJ (2003) Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with gelatine and its effects on articular chondrocytes in vitro. *J Biomed Mater Res* 66A:770-778

15. Curran JM, Chen R, Hunt JA (2005) Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells *in vitro* by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials* 26:7057-7067
16. Curtis AS, Forrester JV (1984): The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. *J Cell Sci* 71:17-35
17. Darling E, Athanasiou K (2005): Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 23:425-432
18. Dessau W, Sasse J, Timpl R, Jilek F, von der Mark K (1978): Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. *J Cell Biol* 79:342-355
19. Dominguez C, Sole E, Fortuny A (2002): *In vitro* lead-induced cell toxicity and cytoprotective activity of fetal calf serum in human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 237:47-53
20. Donati I, Stredanska S, Silvestrini G, Vetere A, Marcon P, Marsich E, Mozetic P, Gamini A, Paoletti S, Vittur F (2005) The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. *Biomaterials* 26:987-998
21. Drumheller PD, Hubbell JA (1994) Polymer Networks with Grafted Cell Adhesion Peptides for Highly Biospecific Cell Adhesive Substrates. *Anal Biochem* 222:380-388
22. Dürr J, Goodman S, Potocnik A, von der Mark H, von der Mark K (1993) Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res* 207:235-244.
23. Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D (1993)  $\beta$ 1 Integrins Mediate Chondrocyte Interaction with Type I Collagen, Type II Collagen, and Fibronectin. *Exp Cell Res* 205:276-285
24. Evans HB, Ayad S, Abedin MZ, Hopkins S, Morgan K, Walton W, Weiss JB, Holt PJL (1983) Localisation of collagen types and fibronectin in cartilage by immunofluorescence. *Ann Rheum Dis* 42:575-581
25. Freshney RI: Tierische Zellkulturen. Ein Methoden-Handbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1990. S. 197, 279-280
26. Glass JR, Dickerson KT, Stecker K, Polarek JW (1996) Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix. *Biomaterials* 17:1101-1108
27. Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hörmann K, Riedel F (2006) *In vitro* analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *Int J Mol Med* 17:301-307
28. Haisch A, Kläring S, Gröger A, Gebert C, Sittlinger M (2002) A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 259:316-321
29. Hayman EG, Pierschbacher MD, Suzuki S, Ruoslahti E (1985) Vitronectin-A Major Cell Attachment-promoting Protein in Fetal Bovine Serum. *Exp Cell Res* 160:245-258

30. Henderson JH, Welter JF, Mansour JM, Niyibizi C, Caplan AI, Dennis JE (2007) Cartilage Tissue Engineering for Laryngotracheal Reconstruction: Comparison of Chondrocytes from Three Anatomic Locations in the Rabbit. *Tissue Eng* 13:843-853
31. Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D (2002) Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg* 127:398-408
32. Hsu SH, Tsai CL, Tang CM (2002) Evaluation of Cellular Affinity and Compatibility to Biodegradable Polyesters and Type-II Collagen-Modified Scaffolds Using Immortalized Rat Chondrocytes. *Artif Organs* 26:647-658
33. Hsu SH, Chang SH, Yen HJ, Whu SW, Tsai CL, Chen DC (2006) Evaluation of Biodegradable Polyesters Modified by Type II Collagen and Arg-Gly-Asp as Tissue Engineering Scaffolding Materials for Cartilage Regeneration. *Artif Organs* 30:42-55
34. Hu Y, Winn SR, Krajchich I, Hollinger JO (2003) Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res* 64A:583-590
35. Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann HJ (2002) Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis cartilage* 10:564-572
36. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1996) A Combined Assay of Cell Viability and *in Vitro* Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518-1520
37. Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He P (1993) A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chem Pharm Bull* 41:1118-1122
38. Jeschke B, Meyer J, Jonczyk A, Kessler H, Adamietz P, Meenen NM, Kantlehner M, Goepfert C, Nies B (2002) RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials* 23:3455-3463
39. Kamil SH, Vacanti MP, Vacanti CA, Eavey RD (2004) Microtia Chondrocytes as a Donor Source for Tissue-Engineered Cartilage. *The Laryngoscope* 114:2187-2190
40. Kinoshita Y, Kuzuhara T, Kirigakubo M, Kobayashi M, Shimura K, Ikada Y (1993a) Reduction in tumor formation on porous polyethylene by collagen immobilization. *Biomaterials* 14:546-550
41. Kinoshita Y, Kuzuhara T, Kirigakubo M, Kobayashi M, Shimura K, Ikada Y (1993b) Soft tissue reaction to collagen-immobilized porous polyethylene: subcutaneous implantation in rats for 20 wk. *Biomaterials* 14:209-215
42. Klee D, Ademovic Z, Bosserhoff A, Hoecker H, Maziolis G, Erli HJ (2003) Surface modification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesion. *Biomaterials* 24:3663-3670
43. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, Tuckwell DS, Farndale RW, Barnes MJ (2000) The Collagen-binding A-domains of Integrins  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens. *J Biol Chem* 275:35-40

44. Kurtis MS, Schmidt TA, Bugbee WD, Loeser RF, Sah RL (2003) Integrin-mediated adhesion of human articular chondrocytes to cartilage. *Arthr Rheum* 48:110-118
45. Lalan S, Pomerantseva I, Vacanti JP (2001) Tissue Engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg* 25:1458-1466
46. Langer R (1997): Tissue Engineering: A new field and its challenges. *Pharm Res* 14: 840-841
47. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue Engineering. *Science* 260:920-926
48. Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Kunz-Shughart LA, Fiedler J, Dahmen C, Hersel U, Kessler H, Schulz MB, Göpferich A (2005) Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides. *Biomaterials* 26:2333-2341
49. Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH (2006) The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* 12:1971-1984
50. LiVecchi AB, Tombes RM, LaBerge M (1994): *In vitro* chondrocyte collagen deposition within porous HDPE: Substrate microstructure and wettability effects. *J Biomed Mater Res* 28:839-850
51. Loeser RF, Carlson CS, McGee MP (1995): Expression of  $\beta 1$  Integrins by Cultured Articular Chondrocytes and in Osteoarthritic Cartilage. *Exp Cell Res* 217:248-257
52. Ma Z, Gao C, Gong Y, Shen J (2005) Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 26:1253-1259
53. Macklis JD, Sidman RL, Shine HD (1985) Cross-linked collagen surface for cell culture that is stable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol* 21:189-194
54. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L, Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S (2005) Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res.* 435:96-105
55. Massia SP, Hubbell JA (1991) An RGD Spacing of 440 nm Is Sufficient for Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -mediated Fibroblast Spreading and 140 nm for Focal Contact and Stress Fiber Formation. *J Cell Biol* 114:1089-1100
56. Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ (1976) Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1674-1678
57. Miller RR, McDevitt CA (1991) A Quantitative Microwell Assay for Chondrocyte Cell Adhesion. *Anal Biochem* 192:380-383
58. Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, Kastenbauer ER, Caplan AI (2004) Tissue Engineering of autologous cartilage grafts in three dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Engineering* 10:1695-706



59. Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI (2002) Immunochemical and Mechanical Characterization of Cartilage Subtypes in Rabbit. *J Histochem Cytochem* 50:1049-1058
60. Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R (2006) Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol* 57:3-8
61. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1997) Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials* 18:769-776
62. Öztürk S, Sengezer M, Coskun Ü, Zor F (2002) An Unusual Complication of a Medpor Implant in Nasal Reconstruction: A Case Report. *Aesth Plast Surg* 26:419-422
63. Pacifici M, Iwamoto M, Golden EB, Leatherman JL, Lee YS, Chuong CM (1993) Tenascin Is Associated With Articular Cartilage Development. *Dev Dyn* 198:123-134
64. Pennypacker JP, Hassell JR, Yamada KM, Pratt RM (1979) The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. *Exp Cell Res* 121: 411-415
65. Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1984) Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5985-5988
66. Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA (1994) Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* 15:774-778
67. Prieto AL, Edelman GM, Crossin KL (1993) Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10154-10158
68. Quint A (2003) Einsatz von nichtresorbierbaren Trägern für das Tissue Engineering von Chondrozyten im Rahmen der Entwicklung eines Hybridsystems. Praktikumsbericht. Klinikum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie.
69. Raghunath J, Salacinski HJ, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM (2005) Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol* 16:503-509
70. Risbud MV, Sitterling M (2002) Tissue Engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol* 20:351-356
71. Röpke E, Schön I, Vogel J, Jamali J, Bloching M, Berghaus A (2007) Screening von modifizierten Polyethylenoberflächen für das Tissue-Engineering von Chondrozyten. *Laryngo-Rhino-Otol* 86:37-43
72. Romo III T, Sclafani AP, Sabini P (1998): Use of porous high-density polyethylene in revision rhinoplasty and in the platyrrhine nose. *Aesth Plast Surg* 22:211-221
73. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A (2004) From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199:174-180

74. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M (1998) Cartilage reconstruction in head and neck surgery: Comparison of bioresorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 42:347-56.
75. Rotter N, Haisch A, Bücheler M (2005) Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262:539-545
76. Ruoslahti E (1991) Integrins. *J Clin Invest* 87:1-5
77. Salter DM, Godolphin JL, Gourlay MS (1995) Chondrocyte Heterogeneity: Immunohistologically Defined Variation of Integrin Expression at Different Sites in Human Fetal Knees. *J Histochem Cytochem* 43:447-457
78. Savarese JJ, Erickson H, Scully SP (1996) Articular Chondrocyte Tenascin-C Production and Assembly into *de Novo* Extracellular Matrix. *J Orthop Res* 14:273-281
79. Schleicher I, Parker A, Leavesley D, Crawford R, Upton Z, Xiao Y (2005) Surface modification by complexes of vitronectin and growth factors for serum-free culture of human osteoblasts. *Tissue Engineering* 11:1688-1698
80. Schmal H, Mehlhorn AT, Fehrenbach M, Müller CA, Finkenzeller G, Südkamp NP (2006) Regulative Mechanisms of Chondrocyte Adhesion. *Tissue Eng* 12:741-750
81. Schmedlen RH, Masters KS, West JL (2002) Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials* 23:4325-4332
82. Schnapp LM, Hatch N, Ramos DM, Klimanskaya IV, Sheppard D, Pytela R (1995) The Human Integrin  $\alpha 8 \beta 1$  Functions as a Receptor for Tenascin, Fibronectin and Vitronectin. *J Biol Chem* 270:23196-23202
83. Schön I, Röpke E, Markwart A, Egger C, Bloching M (2005) Verbesserung der Biokompatibilität von nicht resorbierbarem Knorpelimplantatmaterial durch Beschichtung mit Molekülen der Extrazellulärmatrix. *Biomaterialien* 6(S1):46-47
84. Schön I, Egger C, Markwart A, Glanz D, Neumann K, Roepke E (2008) Tissue Engineering of cartilage in vitro and in vivo. Posterpräsentation (P-Sat-F-414) 8th World Biomaterials Congress 2008 Amsterdam RAI, The Netherlands
85. Schoen I, Rahne T, Markwart A, Neumann K, Berghaus A, Roepke E (2009) Cartilage replacement by use of autologous cells and polyethylene: an experimental study. *J Mater Sci: Mater Med* DOI 10.1007/s10856-009-3775-4
86. Sclafani AP, Romo III T, Silver L (1997) Clinical and histologic behaviour of exposed porous high-density polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg* 99:41-50
87. Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ (1999) Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 103:1809-1818
88. Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR (1994) Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 15:451-456

89. Sittering M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J (1996) Resorbable Polyesters in Cartilage Engineering: Affinity and Biocompatibility of Polymer Fiber Structures to Chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 33:57-63
90. Sittering M, Hutmacher DW, Risbud MV (2004): Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 15:411-418
91. Sommarin Y, Larsson T, Heinegard D (1989): Chondrocyte-Matrix Interactions. *Exp Cell Res* 184:181-192
92. Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA (1993) Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: An explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene. *J Biomed Mater Res* 27:927-940
93. Svoboda KKH (1998) Chondrocyte-matrix attachment complexes mediate survival and differentiation. *Microsc Res Tech* 43:111-122
94. Tallheden T, Karlsson C, Brunner A, Van Der Lee J, Hagg R, Tommasini R, Lindahl A (2004): Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 7:525-535
95. Tsai CL, Hsu SH, Cheng WL (2002) Effect of Different Solvents and Crosslinkers on Cytocompatibility of Type II Collagen Scaffolds for Chondrocyte Seeding. *Artif Organs* 26:18-26
96. Walles T, Giere B, Macchiarini P, Mertsching H (2004) Expansion of Chondrocytes in a Three-Dimensional Matrix for Tracheal Tissue Engineering. *Ann Thorac Surg* 78: 444-449
97. Wellisz T (1993): Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant. *Aesth Plast Surg* 17:339-344
98. Wellisz T, Kanel G, Anooshian RV (1993) Characteristics of the tissue response to Medpor porous polyethylene implants in the human facial skeleton. *J Long Term Eff Med Implants* 3:223-235
99. Woodfield TBF, Miot S, Martin I, van Blitterswijk CA, Riesle J (2006): The regulation of expanded human nasal chondrocyte re-differentiation capacity by substrate composition and gas plasma surface modification. *Biomaterials* 27:1043–1053
100. Yoon JJ, Song SH, Lee DS, Park TG (2004) Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous degradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method. *Biomaterials* 25:5613-5620
101. Zhang WM, Käpylä J, Puranen JS, Knight CG, Tiger CF, Pentikäinen OT, Johnson MS, Farnsdale RW, Heino J, Gullberg D (2003)  $\alpha_{11}\beta_1$  Integrin Recognizes the GFOGER Sequence in Interstitial Collagens. *J Biol Chem* 278:7270-7277
102. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RGS, Francomano CA (2004) Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *Journal of Anatomy* 205:229-237

## **8 Thesen**

1. Knorpelgewebe besitzt ein schlechtes Heilungspotential nach Verletzung. Dies stellt im Besonderen im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich ein Problem dar.
2. Die Herstellung von Knorpelgewebe mittels Tissue Engineering bietet einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Knorpelersatzverfahren.
3. In der vorliegenden experimentellen Studie wird der Einfluss der Beschichtung von porösem Polyethylen mit Molekülen aus der extrazellulären Matrix auf die Adhäsion von Chondrozyten sowie auf die Matrixsynthese der adhärennten Chondrozyten untersucht.
4. Durch Verwendung von Cyclohexylcarbodiimid können die ECM-Moleküle stabil auf der Oberfläche des Polyethylens vernetzt werden.
5. Der WST-1-Assay ist zur Bestimmung der Zelladhäsion an Polyethylen besser geeignet als der MTT-Assay. Die Inkubationszeit sollte 2 Stunden betragen.
6. Die Beschichtung von porösem Polyethylen mit Kollagen II führt zu einer signifikanten Steigerung der Zelladhäsion an das Biomaterial. Die Kombination mehrerer ECM-Moleküle ergab gegenüber unbeschichtetem Polyethylen keine signifikante Erhöhung der Zelladhäsion.
7. Der Zusatz von Fötalem Kälberserum zum Inkubationsmedium hat keinen eindeutigen Effekt auf die Adhäsion von Chondrozyten.
8. Die Beschichtung von porösem Polyethylen mit ECM-Molekülen hat keinen Einfluss auf die Synthese der Matrixmoleküle durch die adhärennten Chondrozyten. Diese wird dagegen von der Dauer der Kultivierung der Zellen auf dem Biomaterial bestimmt.
9. Die auf porösem Polyethylen kultivierten Chondrozyten sind nicht in der Lage einen differenzierten Phänotyp aufrecht zu erhalten. Es trat nach kurzer Zeit eine Dedifferenzierung ein. Es kam nicht zur Bildung von Knorpelgewebe.

**Christian Egger**  
**Bielingstr. 23**  
**90419 Nürnberg**

Geboren am 23. Juni 1978 in München

Ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

## **LEBENS LAUF**

### **Schul Ausbildung**

9/85 – 7/89

Grundschule in Stadtbergen bei Augsburg

9/89 – 6/99

Gymnasium bei St. Anna, Augsburg

6/99

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

### **Zivildienst**

8/99 – 8/2000

„Anderer Dienst im Ausland“ als Alternative zum  
Wehr-/Zivildienst: Pflegerische Tätigkeit in  
Altenheim in Haifa, Israel

### **Studium**

10/2000 – 3/2003

Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

3/2003

Ablegen des Physikums

4/2003 – 2/2006

Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2/2006 – 1/2007

Praktisches Jahr an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg (Klinik für Hals-, Nasen-,  
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie) und der  
Technischen Universität München (Klinikum Rechts

	der Isar, 3.Medizinische Klinik, und Rotkreuz- krankenhaus München, Chirurgische Klinik)
4/2007 – 5/2007	Ablegen des 2.Abschnitts der ärztlichen Prüfung an der Technischen Universität München
6/2007	Approbation als Arzt

**Abgeleistete Famulaturen während des Studiums**

8/2003 – 9/2003	Famulatur in der unfallchirurgischen Ambulanz der BG-Kliniken Bergmannstrost in Halle/Saale
8/2004	Famulatur in der geriatrischen Abteilung des Arrowe Park Hospitals in Wirral, Großbritannien
2/2005 – 4/2005	Famulatur in der chirurgischen Abteilung und Notfall- ambulanz des St. John`s Medical College, Bangalore, Indien
9/2005	Famulatur in der Klinik für Anästhesie und Intensiv- medizin, BG-Kliniken Bergmannstrost, Halle (Saale)

**Beruflicher Werdegang:**

seit 10/2007	Assistenzarzt in der 2. Medizinischen Klinik, Klinikum Bamberg
--------------	---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und andere als die angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Nürnberg, den 01.10.09

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche an irgendeiner Hochschule im In- oder Ausland unternommen habe.

Nürnberg, den 01.10.09



## **Hinweis auf Publikation von Ergebnissen dieser Arbeit**

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gingen in die folgenden Veröffentlichungen ein:

Schön I, Röpke E, Markwart A, Egger C, Bloching M: Verbesserung der Biokompatibilität von nicht resorbierbarem Knorpelimplantatmaterial durch Beschichtung mit Molekülen der Extrazellulärmatrix. *Biomaterialien* 6(S1) (2005) 46-47

Schön I, Egger C, Markwart A, Glanz D, Neumann K, Roepke E: Tissue Engineering of cartilage in vitro and in vivo. Posterpräsentation (P-Sat-F-414) 8th World Biomaterials Congress 2008 Amsterdam RAI, The Netherlands (2008)

Egger C, Schön I, Röpke E, Bloching M: Chondrozyten auf Polyethylen (Medpor®) – Vitalität und Expression von Extrazellulärmatrix (ECM)–molekülen. Posterpräsentation (514), 77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde 2006, Mannheim (2006)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Kerstin Neumann für die Überlassung des interessanten Themas.

Speziell bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. I. Schön für ihre freundliche und kompetente Betreuung dieser experimentellen Arbeit und die ständige Bereitschaft zur Hilfestellung.

Frau Ottilie Pietz und Frau Elke Wolfsteller möchte ich für die Unterstützung in Fragen der Arbeitstechniken herzlich danken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. rer. nat. Torsten Rahne für die freundliche Hilfe in Fragen zur Statistik.

Insgesamt möchte ich mich bei dem gesamten Team des HNO-Forschungslabors für die freundliche Aufnahme und ständige Unterstützung bedanken. Die Zeit der praktischen Tätigkeit für die Promotion war daher eine sehr angenehme und interessante Erfahrung.

Zu Letzt mein besonderer Dank an Helena und meine Familie für ihre ständige Unterstützung.