

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,  
plastische und ästhetische Operationen  
des Universitätsklinikums Würzburg  
Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Dr. h. c. R. Hagen

**EINFLUSS VERSCHIEDENER WACHSTUMS-  
FAKTORKOMBINATIONEN AUF DIE CHONDROGENE  
DIFFERENZIERUNG MESENCHYMALER FETTSTAMMZELLEN  
IN POLYURETHAN-FIBRIN-KONSTRUKTEN**



**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Dorothee Weiss**

aus Erlangen

Würzburg, April 2013

**Referent:** Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Ulrich Nöth, MHBA

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag des Promotionskolloquiums:** 11.11.2014

Die Promovendin ist Zahnärztin

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Stimmlippenlähmung</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ätiologie der einseitigen Stimmlippenlähmung	1
1.1.2	Symptomatik der einseitigen Stimmlippenlähmung	2
1.1.3	Diagnostik der einseitigen Stimmlippenlähmung	2
<b>1.2</b>	<b>Standardisierte Therapieansätze zur Behandlung einseitiger Stimmlippenlähmungen</b>	<b>3</b>
1.2.1	Konservative Behandlungsstrategien	3
1.2.2	Chirurgische Behandlungsstrategien von außen	3
1.2.3	Endoskopische Stimmlippenaugmentation	4
<b>1.3</b>	<b>Tissue Engineering in der Laryngologie</b>	<b>5</b>
1.3.1	Aktuelle zellbasierte Behandlungsstrategien	6
1.3.2	Knorpelrekonstruktion durch mesenchymale Stammzellen	7
<b>1.4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Versuchsaufbau</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Kultivierung der Zellen</b>	<b>13</b>
2.3.1	Zellkultur	13
2.3.2	Passagieren der Zellen	13
2.3.3	Zellzahl	14
2.3.4	Kryokonservierung	14
<b>2.4</b>	<b>Nachweis spezifischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie</b>	<b>15</b>
2.4.1	Grundlagen	15
2.4.2	Durchführung	16

<b>2.5 Multidifferenzierungspotential mesenchymaler Fettstammzellen</b>	<b>18</b>
2.5.1 Adipogene Differenzierung	19
2.5.2 Osteogene Differenzierung	20
2.5.3 Chondrogene Differenzierung	22
<b>2.6 Polyurethan als Trägermaterial</b>	<b>24</b>
2.6.1 Eigenschaften von Polyurethan	24
2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie	24
2.6.3 Herstellung von Polyurethan-Fibrin-Konstrukten	24
2.6.4 Chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten	26
<b>2.7 RNA-Isolierung</b>	<b>28</b>
2.7.1 Grundlagen	28
2.7.2 Durchführung	29
<b>2.8 cDNA-Synthese und Amplifikation mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>30</b>
2.8.1 c-DNA Synthese	30
2.8.2 Grundlagen der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	31
2.8.3 Durchführung	33
<b>2.9 Biochemische Analyse</b>	<b>34</b>
2.9.1 Papain-Gewebeverdaу	34
2.9.2 DNA-Gehalt	35
2.9.3 Glykosaminoglykan-Gehalt	36
2.9.4 Kollagen-Gehalt	37
<b>2.10 Herstellung histologischer Präparate</b>	<b>38</b>
2.10.1 Fixierung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte	38
2.10.2 Gefrierschnitte	38
<b>2.11 Histologische Färbungen</b>	<b>39</b>
2.11.1 Alzianblau-Färbung	39
2.11.2 Safranin O-Färbung	40
<b>2.12 Chromogene Immunhistochemie</b>	<b>41</b>
2.12.1 Grundlagen	41
2.12.2 Durchführung	42

<b>2.13 <i>In vivo</i>-Kaninchenmodell</b>	<b>45</b>
2.13.1 Versuchstiere	45
2.13.2 Versuchsaufbau	46
<b>2.14 <i>In vivo</i>-Operationsverfahren</b>	<b>47</b>
2.14.1 Anästhesie und Behandlungsvorbereitung	47
2.14.2 Nackenfettentnahme	48
2.14.3 Isolierung mesenchymaler Kaninchen-Fettstammzellen aus Nackenfett	48
2.14.4 Chondrogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten	48
2.14.5 Defektsetzung und Einbringen der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte	49
2.14.6 Entnahme der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte	51
<b>2.15 Histologische Aufarbeitung der Kaninchenohr-Biopsien</b>	<b>51</b>
2.15.1 Herstellung histologischer Präparate	51
2.15.2 Histologische Färbungen	52
<b>2.16 Ergebnisauswertung</b>	<b>52</b>
2.16.1 Ergebnisanalyse der Durchflusszytometrie	52
2.16.2 Analyse der relativen Genexpression	53
2.16.3 Auswertung der Ergebnisse der biochemischen Analyse	53
2.16.4 Statistische Auswertung der Daten und ihre Darstellung	54
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>56</b>
<b>3.2 Durchflusszytometrie</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Multidifferenzierungspotential mesenchymaler Fettstammzellen</b>	<b>58</b>
3.3.1 Adipogene Differenzierung	58
3.3.2 Osteogene Differenzierung	59
3.3.3 Chondrogene Differenzierung	60
<b>3.4 Rasterelektronenmikroskopie des Polyurethan-Trägermaterials</b>	<b>61</b>
<b>3.5 Makroskopische Untersuchung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte</b>	<b>62</b>

<b>3.6 Analyse der Genexpression mit der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>63</b>
3.6.1 Genexpression spezifischer Marker-Gene für hyalinen Knorpel	63
3.6.2 Genexpression eines spezifischen Marker-Gens für Faserknorpel	67
<b>3.7 Biochemische Analyse</b>	<b>68</b>
3.7.1 DNA-Gehalt	68
3.7.2 Glykosaminoglykan-Gehalt	69
3.7.3 Kollagen-Gehalt	70
<b>3.8 Histologische Untersuchung</b>	<b>71</b>
3.8.1 Alzianblau-Färbung	72
3.8.2 Safranin O-Färbung	74
<b>3.9 Chromogene immunhistochemische Untersuchung</b>	<b>75</b>
3.9.1 SOX-9	76
3.9.2 Kollagen 2	78
3.9.3 Aggrekan	79
<b>3.10 Analyse der Kaninchenohr-Biopsien</b>	<b>80</b>
3.10.1 Makroskopische Untersuchung 3 und 6 Wochen nach Implantation	81
3.10.2 Histologische Untersuchung der chondrogen vordifferenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte vor Implantation	82
3.10.3 Histologische Untersuchung 3 Wochen nach Implantation	82
3.10.4 Histologische Untersuchung 6 Wochen nach Implantation	85
<b>3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>87</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>88</b>
<b>4.1 Einfluss von Zellkultur und Trägermaterial auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Fettstammzellen</b>	<b>88</b>
4.1.1 Charakteristika mesenchymaler Fettstammzellen	88
4.1.2 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen	90
4.1.3 Polyurethan-Fibrin-Konstrukt als Trägermaterial für Tissue Engineering	92
<b>4.2 Qualität des Knorpelersatzgewebes</b>	<b>94</b>
4.2.1 Genexpression knorpelspezifischer Marker in der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	94

4.2.2	Biochemische Analyse des DNA- und des Glykosaminoglykan- sowie Kollagen-Gehalts	97
4.2.3	Histologische Untersuchung der extrazellulären Matrix des Knorpelersatzgewebes	100
<b>4.3</b>	<b>Polyurethan-Fibrin-Konstrukte im Tiermodell</b>	<b>101</b>
4.3.1	Implantationsmodell am Kaninchen	101
4.3.2	Einheilung und Defektdeckung	103
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>109</b>
<b>6.1</b>	<b>Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien</b>	<b>109</b>
<b>6.2</b>	<b>Messergebnisse und statistische Auswertung</b>	<b>114</b>
6.2.1	Genexpression von SOX-9	114
6.2.2	Genexpression von Kollagen 2	115
6.2.3	Genexpression von Kollagen 9	116
6.2.4	Genexpression von Kollagen 10	117
6.2.5	Genexpression von Aggrekan	118
6.2.6	Genexpression von Kollagen 1	119
6.2.7	Biochemische Analyse des DNA-Gehalts	120
6.2.8	Biochemische Analyse des Glykosaminoglykan-Gehalts	121
6.2.9	Biochemische Analyse des Kollagen-Gehalts	122
<b>6.3</b>	<b>Abürzungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>6.4</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>6.6</b>	<b>Kongressbeiträge und Publikationen</b>	<b>136</b>
<b>6.7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>137</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Stimmlippenlähmung

Der motorische Endast des zehnten Hirnnerves, der Nervus laryngeus recurrens, steuert die Funktion der Stimmlippen im Kehlkopf. Dieser Nerv ist durch seinen anatomischen Verlauf, ausgehend von den Hirnnervenkernen im Hirnstamm bis in den Brustkorb Traumata, Tumorerkrankungen und iatrogenen Schädigungen ausgesetzt. Durch eine Irritation oder Verletzung des Nervus laryngeus recurrens kommt es zu einer Beweglichkeitseinschränkung und zu einer ein- oder beidseitigen Fehlstellung der Stimmlippen. Symptome wie Heiserkeit, Atemnot und Schluckstörungen sind die Folgen.

#### 1.1.1 Ätiologie der einseitigen Stimmlippenlähmung

Durch ein Schädel-Hirn-Trauma oder degenerative Prozesse des zentralen Nervensystems kann es zu einer Schädigung der Hirnnervkerne oder einer Läsion der zentralen Bahnen im Hirnstamm, Kleinhirn oder Großhirn kommen. Bei der sog. Bulbärparalyse treten bei einseitiger Stimmlippenlähmung Schluckbeschwerden, bedingt durch eine Sensibilitätsstörung, und laryngeale Spastiken mit unwillkürlichen Stimmlippenbewegungen auf (Friedrich et al., 2005). Zudem kann ein infiltrierendes Tumorstadium, ausgehend von Tumoren der Schädelbasis, des Kehlkopfes, des Rachenraumes oder der Speiseröhre zu einem Funktionsverlust des Nervus laryngeus recurrens führen (Loughran et al., 2002, Wendler et al., 2005). Bei chirurgischen Eingriffen im Kopfhalsbereich besteht ein erhöhtes Risiko, den Nervus laryngeus recurrens intraoperativ zu schädigen (Ollivere et al., 2006). Vor allem im Rahmen von Schilddrüsenoperationen zur Entfernung einer gutartigen Struma oder einer bösartigen Neubildung tritt häufig eine konsekutive Bewegungsstörung der Stimmlippen auf. Bei Schilddrüsenoperationen zur Therapie gutartiger Schilddrüsenerkrankungen kommt es bei 0%-7,1% der Fälle zu einer vorübergehenden und in 0%-11% zu einer permanenten Lähmung der Stimmlippen (Dralle et al., 2008). Postoperative Stimmlippenlähmungen können auch nach halsfernen chirurgischen Eingriffen auftreten (Laursen et al., 1998). Bei einem präoperativ intakten Glottisschluss wurden durch intralaryngeale Druckschädigungen des

Nervus laryngeus recurrens während einer Intubationsnarkose vermehrt Rekurrenslähmungen beobachtet (Cavo, 1985, Friedrich et al., 2000). Des Weiteren kann in Fällen unklarer Genese eine entzündliche Lähmung, bedingt durch Infektionen mit Borrelien, humanem Papillomavirus oder Lues vorliegen (Sittel et al., 2008).

### **1.1.2 Symptomatik der einseitigen Stimmlippenlähmung**

Bei einer einseitigen Stimmlippenlähmung ist der Schwingungsablauf der betroffenen Stimmlippe während der Stimmbildung eingeschränkt. Der unvollständige Glottisschluss, bedingt durch einen einseitigen Stimmlippenstillstand, führt zu einem erhöhten Luftverbrauch beim Sprechen und zu einer verminderten Stimmleistungsfähigkeit. Die Stimmqualität steigert sich, je weiter die gelähmte Stimmlippe bei geringem verbleibenden Restspalt der Glottis in die Mittellinie reicht. Neben einer heiseren und behauchten Stimme ist auch eine Schluckstörung nicht selten die Folge einer einseitigen Stimmlippenlähmung. In einer Studie von Ollivere und Mitarbeitern wurde bei 56% der untersuchten Patienten, die an einer einseitigen Stimmlippenlähmung litten, zusätzlich zu einer verminderten Stimmleistungsfähigkeit eine Schluckstörung festgestellt. Davon hatten wiederum 63% Hinweise auf eine Aspiration oder einen abgeschwächten Hustenreflex. Aufgrund des unvollständigen Glottisschlusses beim Hustenvorgang ist ein Druckaufbau nicht mehr möglich und der Hustenstoß somit deutlich vermindert. Die Autoren halten jedoch eine Sensibilitätsstörung der Kehlkopfschleimhaut für die bessere Erklärung einer Schluckstörung im Rahmen einer Stimmlippenlähmung als einen unvollständigen Glottisschluss (Ollivere et al., 2006).

### **1.1.3 Diagnostik der einseitigen Stimmlippenlähmung**

In den meisten Fällen lassen sich durch die Anamnese mögliche Ursachen einer Lähmung des Nervus laryngeus recurrens herausfinden (Merati et al., 2006). Bei bestehendem Verdacht auf eine Irritation oder Durchtrennung des Nervus laryngeus recurrens lässt sich die Beweglichkeit der Stimmlippen mittels indirekter Laryngoskopie überprüfen. Um zusätzlich eine neurogene Lähmung von einer arthrogenen Lähmung zu unterscheiden, eignet sich eine Elektromyographie des Kehlkopfes. Bei diesem elektrophysiologischen Verfahren wird

zudem die Art der Nervenschädigung beurteilt und gleichzeitig ein Hinweis auf die Ausheilungswahrscheinlichkeit gegeben (Volk et al., 2012). Mittels bildgebender Verfahren wie Computer- oder Magnetresonanztomographie lässt sich der gesamte Verlauf des Nervus laryngeus recurrens darstellen, um zum Beispiel einen infiltrierenden Tumor auszuschließen (MacGregor et al., 1994).

## **1.2 Standardisierte Therapieansätze zur Behandlung einseitiger Stimmlippenlähmungen**

### **1.2.1 Konservative Behandlungstrategien**

Bei Bewegungsstörungen der Stimmlippen wird mittels logopädischer Stimmtherapie versucht, den Glottisschluss zu optimieren und die Stimme zu kräftigen. Bei dieser sog. laryngealen Kompensation wird der Glottisschluss alleine durch die nicht gelähmte Stimmlippe bewältigt. Neben logopädischer Stimmübungsbehandlung kann mittels Elektrotherapie die gelähmte Kehlkopfmuskulatur wieder aktiviert werden. Durch einen perkutanen Reizstromimpuls wird die Funktion des betroffenen Nervs stimuliert und die gelähmte Muskulatur bewegt. Dadurch wird der lähmungsbedingte Abbau der Muskulatur verzögert. Bei manchen Patienten reichen diese funktionellen Therapieoptionen nicht aus, um den glottischen Restspalt zu verringern und ein chirurgischer Eingriff wird notwendig (Friedrich et al., 2005, Wendler et al., 2005).

### **1.2.2 Chirurgische Behandlungstrategien von außen**

Bei einem unvollständigen Glottisschluss im Rahmen einer einseitigen Stimmlippenlähmung wird durch einen chirurgischen Eingriff die gelähmte Stimmlippe zur Mittellinie verlagert, um bei der Phonation die Gegenseite vollständig mit der gesunden Stimmlippe zu verschließen. Die Stimmlippenmedialisierung hat nicht nur eine positive Auswirkung auf die Stimmqualität, sondern auch auf das Schluckvermögen. Durch einen verbesserten Glottisschluss werden die Atemwege während des Schluckvorgangs besser abgedichtet und die Wahrscheinlichkeit, dass Speichel oder Nahrungsreste in die Atemwege eindringen, verringert (Ollivere et al., 2006, Tateya et al., 2010).

Zur Behandlung von einseitigen Stimmlippenlähmungen entwickelte der österreichische Militärarzt Payr eine Plastik am Kehlkopfknorpel von au-

ßen (Payr, 1915). Diese Methode, einen inkompletten Glottisschluss über einen transzervikalen Zugang zu behandeln, wurde durch den Japaner Isshiki als Thyroplastik Typ I wieder aufgegriffen und standardisiert (Isshiki et al., 1974). Während der letzten Jahrzehnte wurde die Thyroplastik Typ I nach Isshiki weiter modifiziert, um das Implantatmaterial, dessen Platzierung und die Operationszeit zu verbessern. Um eine Optimierung der Stimmqualität zu erreichen, wird in Lokalanästhesie, und somit unter Kontrolle der Stimmqualität, auf Höhe der gelähmten Stimmlippe ein kleines Fenster im Kehlkopfknorpel angelegt, um von dort aus durch ein Implantat beispielsweise aus körpereigenem Knorpel die Stimmlippe nach medial zu verlagern (Wendler et al., 2005). Das von Friedrich (Friedrich, 1998) entwickelte Titanimplantat für die Thyroplastik Typ I ermöglicht einen einfach durchzuführenden, zeitsparenden Eingriff und eine hinreichende Fixierung des Implantats am Kehlkopfknorpel. Bei dieser Medialisierungsthyroplastik wird ebenfalls in Lokalanästhesie ein Knorpelfenster aus dem Kehlkopfknorpel auf Höhe der gelähmten Stimmlippe herausgebohrt und ein Titanimplantat unter Kontrolle der Stimmqualität in eine subperichondrale Tasche implantiert. Das Titanimplantat wird mit monofilem, nichtresorbierbarem Faden fixiert (Friedrich et al., 2005).

In den Kehlkopfknorpel eingebrachte körperfremde Implantate können jedoch dislozieren, extrudieren und zu Infektionen führen. Im Fall einer Extrusion und Dislokation des Implantats nach endolaryngeal wird der Atemweg beeinträchtigt und erfordert einen erneuten chirurgischen Eingriff zur Entnahme des Implantats (Halum et al., 2005).

### **1.2.3 Endoskopische Stimmlippenaugmentation**

Die Stimmlippenaugmentation zur Behandlung eines unvollständigen Glottisschlusses wurde bereits 1911 von Brünings durchgeführt, der die Stimmlippen durch eine Injektion mit Paraffinöl medialisierte (Brünings, 1911). Zur Verbesserung der Stimmqualität werden seitdem unterschiedliche synthetische, nichtresorbierbare Füllsubstanzen wie Silikon, Calciumhydroxylapatit und Polydimethylsiloxan endoskopisch injiziert (King et al., 2007). Durch die laterale Unterfütterung der gelähmten Stimmlippe wird deren Volumen vergrößert. Diese kann somit der gesunden Stimmlippe angenähert werden. Nach der Injektion der synthetischen Materialien treten jedoch nicht selten immunologische Fremdkörper-

reaktionen, Infektionen und Dislokationen auf (Baijens et al., 2007). Das für die Stimmlippenaugmentation eingesetzte Teflon führte zu Granulombildung und erforderte eine operative Entfernung des eingebrachten Materials (Pagedar et al., 2009). Über neuere texturierte Materialien, z.B. Polydimethylsiloxan, liegen erste positive Ergebnisse vor. Eine laterale Injektion von Polydimethylsiloxan-Partikeln in den paraglottischen Raum ermöglicht ohne Fremdkörperreaktion eine permanente Stimmlippenaugmentation sowie eine anhaltende Verbesserung der Stimmqualität (Sittel et al., 2006, 2008).

Für die Stimmlippenaugmentation kommen auch physiologische, resorbierbare Materialien zum Einsatz. Mittels endoskopischer Injektion von Rinderkollagen, Hyaluronsäurepräparaten oder körpereigenem Fettgewebe kann die gelähmte Stimmlippe medialisiert werden. Studien über die in die Stimmlippe injizierten resorbierbaren Substanzen belegen, dass das applizierte glutaraldehydquervernetzte Rinderkollagen innerhalb von 6-18 Monaten vom Körper wieder abgebaut wird und im Verlauf eine erneute Verschlechterung der Stimmqualität eintritt (Remacle et al., 2007). Für eine vorübergehende Stimmverbesserung kann alternativ zu Kollagen ein Hyaluronsäure-Hydrogel tierischen Ursprungs endoskopisch injiziert werden, das nach 3-6 Monaten vom Körper abgebaut wird (Segura et al., 2005). Diese frühzeitige Resorption wird auch bei der Injektion körpereigenen Fettgewebes beobachtet (McCulloch et al., 2002). Die kurzfristig erzielten Ergebnisse der verbesserten Stimmqualität sind zufriedenstellend, jedoch bleibt die Beständigkeit des eingebrachten Materials und dessen Resorption unvorhersehbar (Laccourreya et al., 2003a, b). Bislang gibt es keine resorbierbaren Materialien, die eine stabile und langandauernde Stimmlippenaugmentation ermöglichen.

### 1.3 Tissue Engineering in der Laryngologie

Ein vielversprechendes Therapiekonzept zur Rekonstruktion geschädigter Gewebestrukturen stellt die Züchtung natürlichen Gewebes außerhalb des menschlichen Körpers dar. Ziele dieser Gewebezüchtung *in vitro* sind in Anlehnung an die von Skalak gegebene Begriffsdefinition von Tissue Engineering (Skalak, 1988):

- Unterstützung natürlicher Heilungsprozesse

- Regeneration funktionsunfähigen Gewebes
- Ersatz und Rekonstruktion zerstörten Gewebes.

Das Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, das biomedizinische Wissenschaften mit werkstoffkundlichen Ingenieurwissenschaften verknüpft, um Gewebedefekte des menschlichen Körpers zu rekonstruieren. Die Strategie des Tissue Engineerings beruht darauf, körpereigene Zellen eines Spender-Organismus durch einen chirurgischen Eingriff zu entnehmen, um diese anschließend *in vitro* zu vermehren. Zur Generierung einer natürlichen extrazellulären Matrix *in vitro* werden die isolierten Zellen je nach Zellart auf ein histoinduktives zwei- oder dreidimensionales Trägermaterial aufgebracht. Das auf diese Weise *in vitro* neu gezüchtete Gewebe kann anschließend dem Spender-Organismus implantiert werden (Borges et al., 2003).

### 1.3.1 Aktuelle zellbasierte Behandlungsstrategien

Für eine zellbasierte Therapie vernarbter sowie gelähmter Stimmlippen existieren bereits unterschiedliche Ansätze in der Literatur. Körpereigene, in die betroffene Stimmlippe injizierte Zellen produzieren weiterhin Extrazellulärmatrix und können durch diese neue Gewebeproduktion die Flexibilität der betroffenen Stimmlippe sowie die Stimmqualität verbessern. Hauptsächlich wurden bislang zellbasierte Behandlungsmethoden zur Therapie vernarbter Stimmlippen untersucht. Stimmlippennarben zerstören die epitheliale Schichtstruktur der Stimmlippen und können zu einem unvollständigen Glottisschluss und einem eingeschränkten Schwingungsablauf der Stimmlippen führen. Aus diesem Grund wurden mehrere Zellarten untersucht, die sich für die Therapie von Stimmlippennarben und -lähmungen anbieten. Eine Arbeitsgruppe untersuchte die Auswirkung einer Injektion autologer Fibroblasten in vernarbte Stimmlippen sowohl in einem Tiermodell als auch in einer klinischen Studie an erwachsenen humanen Probanden (Chhetri et al., 2004, 2011). Diese Wissenschaftler stellten nach der Injektion autologer Fibroblasten eine Verbesserung der Stimmqualität fest, die auch 12 Monate nach Studienbeginn aufrechterhalten werden konnte. Weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Einsatzmöglichkeit adulter mesenchymaler Stammzellen für die Therapie vernarbter Stimmlippen. Kanemaru und Mitarbeiter injizierten in Kollagen suspendierte körpereigene Knochenmarkstammzellen in geschädigte Stimmlippen von Ratten. Nach 2 Monaten war eine geringere

Atrophie und erhöhte Beweglichkeit der Stimmlippen zu beobachten (Kanemaru et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse erzielten Lee und Mitarbeiter, die durch Elektrokauterisation die Stimmlippen von Hunden verletzten und anschließend in Kollagen eingebrachte Fettstammzellen injizierten. 6 Wochen nach der Zellinjektion nahm die Atrophie der defekten Stimmlippe ab und die Verletzung der Stimmlippe heilte ohne Narbenbildung (Lee et al., 2006). Der Arbeitsgruppe Long gelang zudem der Nachweis, dass aus humanen adulten mesenchymalen Fettstammzellen in einem dreidimensionalen Fibrin-Konstrukt die Schichtstruktur der Stimmlippen mit epithelialelem und mesenchymalem Zell-Phänotyp unter definierten Kulturbedingungen *in vitro* nachgebildet werden kann (Long et al., 2010). Dagegen beschäftigte sich die Arbeitsgruppe Skodacek nicht mit der Fragestellung geschädigtes Stimmlippenepithel zu rekonstruieren und zu regenerieren, sondern mit der Fragestellung, eine zellbasierte Methode zur Stimmlippenaugmentation zu entwickeln. Die Wissenschaftler injizierten Knorpelzellen zusammen mit einem langzeitstabilen Fibrin-Hydrogel *in vitro* in den paraglottischen Raum eines Schweine-Kehlkopfmodells. Die erzielten Ergebnisse der Untersuchung der Stimmlippenschwingung und -symmetrie waren vergleichbar mit den bereits klinisch getesteten Materialien wie Kollagen und Hyaluronsäure. Der Vorteil ist jedoch, dass die Knorpelzellen in dem langzeitstabilen Fibrin-Hydrogel durch die fortbestehende Synthese der extrazellulären Matrix das injizierte Fibrin-Hydrogel dauerhaft stabilisierten (Skodacek et al., 2012).

### 1.3.2 Knorpelrekonstruktion durch mesenchymale Stammzellen

Die bisher verfügbaren Therapiekonzepte zur Behandlung von einseitigen Stimmlippenlähmungen erscheinen nicht vollends zufriedenstellend. Tissue Engineering ermöglicht die Herstellung von Knorpelersatzgewebe, das sich in Zukunft als Implantat für Thyroplastiken und als Augmentationsmaterial zur Therapie einseitiger Stimmlippenlähmungen anbietet. Die Verwendung körpereigener Zellen und biokompatibler Trägermaterialien reduziert die immunologische Fremdkörperreaktion. Die Gewinnung körpereigener Knorpelzellen geht einher mit einer hohen Hebedefektmorbidität, zudem verändern primäre Knorpelzellen während der Expansion in Zellkulturflaschen ihren Phänotyp, dedifferenzieren in einen Fibroblasten-ähnlichen Zelltyp und verlieren dabei ihre Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu synthetisieren (Schnabel et al., 2002). Unter diesen Aspek-

ten gewinnt die Verwendung adulter mesenchymaler Stammzellen zunehmend an Bedeutung.

Adulte humane mesenchymale Stammzellen können aus unterschiedlichen Geweben wie Knochenmark (Friedenstein et al., 1966), Fettgewebe (Zuk et al., 2001), Periost (Nakahara et al., 1991), Synovialmembran (De Bari et al., 2001) oder Muskelgewebe (Bosch et al., 2000) isoliert werden. Diese mesenchymalen Stammzellen sind in der Lage, sich selbst zu erneuern und sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Deans et al., 2000). Mesenchymale Stammzellen werden zunehmend in der regenerativen Medizin eingesetzt und weisen folgende Eigenschaften auf (Dominici et al., 2006, Gimble et al., 2003, 2007):

- reichliches Vorkommen
- einfache Ernte durch minimal-invasive Eingriffe
- Bindungseigenschaften an Kunststoff
- Multidifferenzierungspotential
- stammzellspezifische Oberflächenmarker
- sichere und effektive Transplantation.

Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe, sog. adipose-derived stem cells (ASCs), erfüllen diese Anforderungen. Aus patienteneigenem Fettgewebe werden durch minimal invasive Eingriffe beträchtliche Mengen an mesenchymalen Stammzellen gewonnen. Aus 1 g Fettgewebe können ca. 5000 mesenchymale Fettstammzellen isoliert werden und somit 500-mal mehr mesenchymale Stammzellen als aus 1 g Knochenmark (Kitagawa et al., 2006). Zudem besitzen mesenchymale Fettstammzellen die Fähigkeit, sich in verschiedene mesenchymale Zelllinien wie Knochen, Fett und Knorpel zu differenzieren (Zuk et al., 2001). Bei Untersuchungen stammzellspezifischer Oberflächenmarker zeigten mesenchymale Fettstammzellen eine ähnliche Expression wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, sog. bone marrow-derived stem cells (BMSCs) (De Ugarte et al., 2003). Bereits vor 11 Jahren bestätigten Erickson und Mitarbeiter die Fähigkeit mesenchymaler Fettstammzellen, sich in Matrix produzierende Knorpelzellen zu differenzieren (Erickson et al., 2002). Diese Fähigkeit soll zukünftig in der Laryngologie genutzt werden, um mesenchymale Fettstammzellen als Zellquelle für die Entwicklung von Knorpelersatzgewebe zur Implantation und Rekonstruktion zu nutzen.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Für die Entwicklung von Knorpelersatzgewebe können mesenchymale Fettstammzellen *in vitro* zu Knorpelzellen differenziert werden. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen auf die Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt untersucht. Um die Resorption, Abstoßungsreaktion und Entzündungsreaktion des Knorpelersatzgewebes beurteilen zu können, werden mit autologen mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in die Ohrmuschel von Kaninchen implantiert.

Dabei stellen sich folgende Fragen:

- Besitzen die isolierten mesenchymalen Fettstammzellen stammzelltypische Eigenschaften?
- Ist ein hydrophiler, offenporiger Polyurethanschaum in Kombination mit einem langzeitstabilen Fibrin-Hydrogel als Trägermaterial für die Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Fettstammzellen geeignet?
- Welche Wachstumsfaktorkombination ist zu wählen, um aus mesenchymalen Fettstammzellen das bestmögliche Knorpelersatzgewebe *in vitro* zu züchten?
- Nehmen erhöhte Wachstumsfaktorkonzentrationen Einfluss auf die Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Fettstammzellen?
- Wie verhalten sich chondrogen vordifferenzierte mesenchymale Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach Implantation in einem Tiermodell?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe

Die Idee und Durchführung der Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe, sog. mesenchymale Fettstammzellen, geht auf Rodbell und Jones zurück (Rodbell et al., 1966). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolierung von humanen mesenchymalen Fettstammzellen aus Fettgewebe, welches im Rahmen einer Bauchdeckenstraffung (n = 4) gewonnen wurde. Das entnommene Bauchfettgewebe wurde von den Kollegen der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Meffert) zur Verfügung gestellt. Das aus dem Operationssaal steril überführte Fettgewebe wurde in der sterilen Werkbank mit Hilfe von chirurgischen Skalpelln von der Hautschicht abpräpariert und zerkleinert. In sterilen Schott-Glasflaschen (Schott AG, Mainz) erfolgte unter Verwendung von 500 ml 1 x Phosphatpufferlösung (PBS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vermischt mit 10 ml Penicillin/Streptomycin (P/S, Biochrom AG, Berlin) die Reinigung des Fettgewebes. Mit Einwegpipetten aus Plastik (25 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) wurde das PBS-P/S-Gemisch vom Boden der Glasflasche abgesaugt. Durch Zugabe von 20 mg in 200 ml PBS-P/S gelöster und steril filtrierter Collagenase P (Roche Diagnostics GmbH) erfolgte über einen Zeitraum von 3 h bei 37°C der Verdau von 200 ml zerkleinertem Fettgewebe im Schüttelinkubator (Edmund Bühler GmbH, Tübingen). Nach der Aufteilung des verdauten Fettgewebes auf 50 ml Falconröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) und nach Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg) mit 1300 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) ließen sich 3 Phasen erkennen: am Boden des Röhrchens das Zellkugelchen, darauf die aus Blut bestehende Phase und oben die gelbliche Phase mit reifen Adipozyten. Die beiden oberen Phasen wurden durch vorsichtiges Dekantieren entsorgt. Um noch vorhandene Erythrozyten zu entfernen, wurde ein Erythrozyten-Lysepuffer hergestellt. In 100 ml destilliertem Wasser (Phönix GmbH, Sundern) wurden 4,1 g Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) und 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>) gelöst, 700 µl 0,02 mM EDTA (alle, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) hinzugegeben und der pH-Wert auf 8 eingestellt. In 5 ml des auto-

klavierten Erythrozyten-Lysepuffer wurde das Zellkugelchen resuspendiert, der Inhalt von 4 Falconröhrchen, insgesamt 20 ml, vereinigt und für 10 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 1300 rpm für 10 min bei RT konnte der Überstand vorsichtig abgesaugt werden. Das Zellkugelchen wurde dann in 10 ml PBS-P/S resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Das so gereinigte und pelletierte Zellmaterial, bestehend aus einem stromalen Zellgemisch aus Makrophagen, Perizyten und Präadipozyten, konnte im Folgenden in 10 ml Expansionsmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1, Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt), vermischt mit 10%-igem fötalem Kälberserum (FCS, Linaris, Wertheim-Bettingen), 1% Penicillin und 1% Streptomycin (P/S, Biochrom AG), resuspendiert werden. Mit Hilfe eines 100 µm Zellsiebs (Biosciences, Bedford, MA, USA) wurden noch vorhandene Gewebefragmente entfernt. Die filtrierte Zellsuspension der stromalen vaskulären Zellfraktion (SVF), auch bezeichnet als mesenchymale Fettstammzellen, wurde unter Zugabe von 25 ml Expansionsmedium (DMEM, 1% P/S, 10%-igem FCS) in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) überführt. Diese primären mesenchymalen Fettstammzellen, bezeichnet als Passage 0-Zellen (P 0), wurden bis Passage 2 expandiert und dann für die geplanten Differenzierungsversuche im Einfriermedium im Stickstofftank aufbewahrt.

Für die geplanten Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Fettstammzellen von 4 weiblichen Patienten im Alter von 31-43 Jahren verwendet. Die 4 Patientinnen waren in der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Würzburg, zur stationären Behandlung und Durchführung einer Bauchdeckenstraffung aufgenommen worden. Vor dem operativen Eingriff der Bauchdeckenstraffung erfolgte jeweils die Aufklärung der Patientinnen über die Verwendung des entnommenen Fettgewebes für Forschungszwecke. Für die Isolierung der mesenchymalen Fettstammzellen aus dem operativ gewonnenen Fettgewebe erfolgte die schriftliche Einverständniserklärung der Patientinnen. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Ethikantrag, Genehmigungsnummer 72/06).

## 2.2 Versuchsaufbau

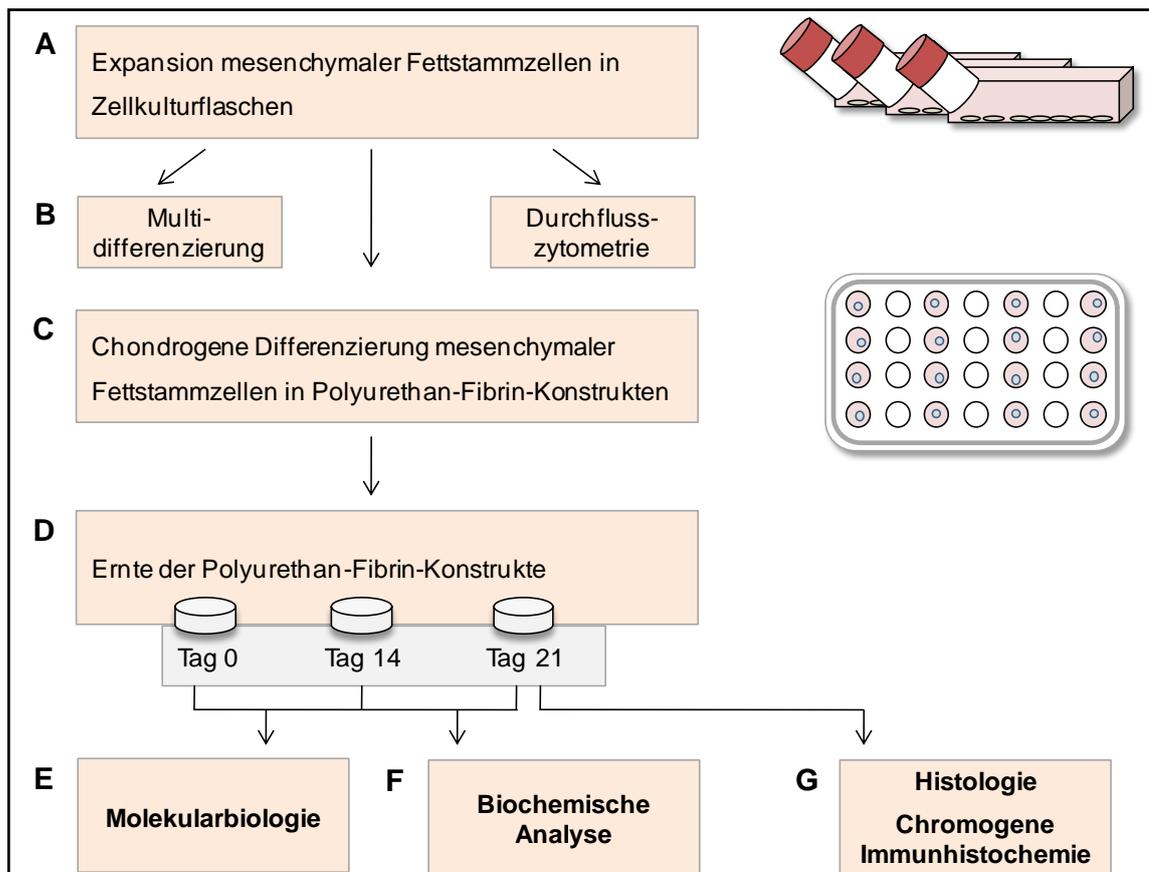


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Nach der Isolierung mesenchymaler Fettstammzellen aus Fettgewebe wurden die Zellen in Zellkulturflaschen vermehrt. Stammzellspezifische Eigenschaften der mesenchymalen Fettstammzellen wurden mittels Multidifferenzierung und Durchflusszytometrie untersucht. Durch Zugabe unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen wurde eine chondrogene Differenzierung in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten induziert. An den Tagen 0, 14 und 21 erfolgte eine molekularbiologische und biochemische Analyse der Konstrukte. Am Tag 21 wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte histologisch untersucht.

Für die Versuche wurden die humanen mesenchymalen Fettstammzellen ( $n = 4$ ) bis Passage 2 expandiert und anschließend bis zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuchsreihen im Stickstofftank kryokonserviert. Aufgetaute mesenchymale Fettstammzellen wurden bis Passage 3 in Zellkulturflaschen expandiert (Abb. 1, A). Für eine Versuchsreihe zur Charakterisierung der eingesetzten mesenchymalen Fettstammzellen wurden solche der Passage 3 auf ihre spezifischen Oberflächenmarker mit der Durchflusszytometrie und histologisch auf ihr Multidifferenzierungspotential untersucht (Abb. 1, B). Weitere mesenchymale Fettstammzellen der Passage 3 wurden zur chondrogenen Differenzierung in Polyurethan-Fibrin-Konstrukte eingebracht (Abb. 1, C). Dem

chondrogenen Differenzierungsmedium wurden verschiedene Wachstumsfaktoren bzw. Wachstumsfaktorkombinationen zugefügt. Eine weitere Gruppe der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurde mit Expansionsmedium inkubiert. Die Ernte der besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte erfolgte an den Tagen 0, 14 und 21 (Abb. 1, D). Die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden an diesen Erntezeitpunkten molekularbiologisch mit der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion auf knorpelspezifische Marker-Gene und biochemisch auf ihren DNA-, Glykosaminoglykan- und Kollagen-Gehalt untersucht (Abb. 1, E, F). Nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung erfolgte eine histologische Untersuchung mit Alzianblau- und Safranin O-Färbung sowie eine chromogene Immunhistochemie der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte (Abb. 1, G).

## 2.3 Kultivierung der Zellen

### 2.3.1 Zellkultur

Die Expansion der mesenchymalen Fettstammzellen erfolgte in belüfteten Monolayer-Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio-One GmbH) unter Zugabe von 25 ml Expansionsmedium in einem Brutschrank (CO<sub>2</sub> Inkubator NU5500E, NuAire Inc., Plymouth, MA, USA) bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 100% Luftfeuchtigkeit. Bei dem verwendeten Expansionsmedium handelte es sich um Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 high glucose (DMEM, Gibco®, life technologies™ GmbH), dem 10%-iges fötales Kälberserum (FCS, Linaris), 1% Penicillin und 1% Streptomycin zugefügt wurden. Nach regelmäßig durchgeführter mikroskopischer Untersuchung (Mikroskop, 473028, ZEISS, Oberkochen) der Zellkulturen auf Zellwachstum, Zelldichte und Kontamination, erfolgte an jedem zweiten Tag ein Wechsel des gesamten Expansionsmediums. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die adhärennten mesenchymalen Fettstammzellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und auf 2 bis 3 neue Zellkulturflaschen verteilt, um eine weitere Proliferation der mesenchymalen Fettstammzellen zu ermöglichen.

### 2.3.2 Passagieren der Zellen

Für den Vorgang des Passagierens erfolgte nach dem Waschen der mesenchymalen Fettstammzellen mit 5 ml 1 x PBS (Roche Diagnostics) die Zugabe

von 5 ml 0,25%-igem Trypsin-EDTA (Gibco®, life technologies™ GmbH). Nach einer fünfminütigen Inkubation der mit Trypsin bedeckten Monolayerkultur im Brutschrank wurde das Ablösen der adhärennten mesenchymalen Fettstammzellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von 5 ml Expansionsmedium wurde die enzymatische Wirkung des Trypsins gestoppt. Jeweils 5 ml des vorliegenden Gesamtvolumens von 10 ml wurden auf neue Zellkulturflaschen verteilt und weitere 20 ml Expansionsmedium pro Zellkulturflasche dazugegeben. Dieser Vorgang des Passagierens der mesenchymalen Fettstammzellen wurde mit den jeweiligen Zellkulturen bis zum Erreichen der Passagen 2 bzw. 3 wiederholt.

### 2.3.3 Zellzahl

Die mesenchymalen Fettstammzellen wurden wie bereits unter 2.3.2 beschrieben, vom Flaschenboden abgelöst, um vor der Versuchsdurchführung bzw. der Kryokonservierung ihre Vitalität und die Zellzahl zu bestimmen. Mit Hilfe des automatisierten Zellzählgerätes CASY (Innovatis AG, Reutlingen) konnten diese zwei Parameter ermittelt werden. Nach dem Ablösen wurde die Zellsuspension aus einer Zellkulturflasche jeweils in 15 ml sterile Falconröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt. Die für die Messung notwendigen CASY Cups (Innovatis AG) wurden mit 100 µl der jeweiligen Zellsuspension und 10 ml steril filtriertem CASY Ton (Innovatis AG) gefüllt. Nach der Vermischung der zwei Flüssigkeiten führte das Gerät drei Messungen pro Probe durch und bestimmte deren Mittelwerte. Die so gemessene Zellzahl und Vitalität der expandierten mesenchymalen Fettstammzellen diente als Grundlage für die weiteren Versuche.

### 2.3.4 Kryokonservierung

Nach Erreichen der Hälfte der für jede geplante Versuchsreihe notwendigen Zellzahl von ca.  $16 \times 10^6$  wurden die mesenchymalen Fettstammzellen abgelöst, die genaue Zellzahl wie oben beschrieben bestimmt und die mesenchymalen Fettstammzellen anschließend bis zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eingefroren und konserviert. Die abgelösten mesenchymalen Fettstammzellen wurden in ein steriles 15 ml Falconröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt und für 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Um eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Einfriermedium zu erhalten, erfolgte die Resuspension der

pelletierten Zellen in einer entsprechenden Menge an Einfriermedium. Dieses bestand aus 80% FCS und jeweils 10% P/S und Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid sollte eine Zerstörung der Zellmembran durch Eiskristalle verhindert werden. Jeweils 1 ml der mit Einfriermedium verdünnten Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark) abgefüllt und anschließend in einem mit Isopropanol gefüllten Mr. Frosty Einfrierbehälter (Temperaturabfall:  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , Nalgene® Labware) für mindestens 2 Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach der langsamen und zellschonenden Einfriermethode wurden die einzelnen Kryoröhrchen für eine langfristige Konservierung in flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  überführt. Vor jeder Versuchsdurchführung wurden die jeweiligen Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank (Air liquide-DMC, Marne-la-Vallée, Frankreich) entnommen und im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad (Julabo U37, A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg) aufgetaut. In mit 25 ml Zellkulturmedium gefüllten  $175\text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen erfolgte die Aussaat von jeweils  $1 \times 10^6$  mesenchymalen Fettstammzellen der aufgetauten Zellsuspension. Der erste Mediumwechsel wurde nach 24 h durchgeführt.

## 2.4 Nachweis spezifischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

### 2.4.1 Grundlagen

Die FACS-Analyse, die sog. "Fluoreszenz-aktivierte Zellfluss Sortierung", beruht auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie, bei der durch die Untersuchung von Streulicht- und Fluoreszenz-Signalen Zelleigenschaften bestimmt werden können. Die in einer Trägerflüssigkeit suspendierten Zellen passieren ein gläsernes Röhrensystem. Die Verringerung des Röhrendurchmessers führt zu einer Passage einzelner Zellen, die von einem Laserstrahl erfasst werden. Dessen Streulicht wird unter verschiedenen Winkeln von Detektoren aufgenommen. Der Anteil des Vorwärtsstreulichts wächst mit zunehmender Zellgröße, während die Intensität des Seitwärtsstreulichts abhängig von der Zellstruktur ist. Trifft ein Laserstrahl auf Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper, wird die Energie des Laserlichts teilweise von dem angelagerten Fluorchrom absorbiert, die restliche Energie wird als Licht größerer Wellenlänge emittiert und von einem

Grundfluoreszenzdetektor registriert. Abhängig von mehreren eingesetzten Laserfrequenzen geben die detektierten Emissionsspektren Auskunft über die erfolgte Kopplung der fluoreszenzmarkierten Antikörper auf der Zelloberfläche (s. Abb. 2).

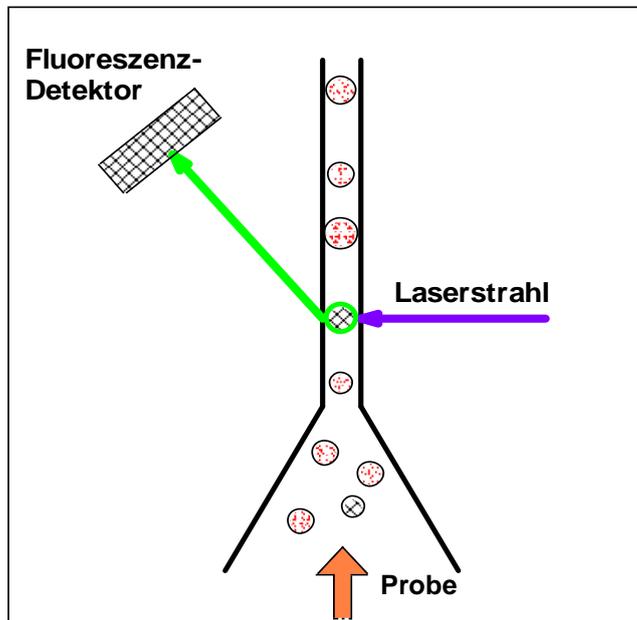


Abb. 2: Schematische Darstellung des Prinzips der FACS-Analyse. Ein Laserstrahl trifft auf die Probe, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper markiert ist. Nicht absorbierte Energie wird als Licht größerer Wellenlänge emittiert und von einem Grundfluoreszenzdetektor registriert. Die detektierten Emissionsspektren kennzeichnen die erfolgte Kopplung der fluoreszenzmarkierten Antikörper auf der Zelloberfläche.

Die Computeranalyse der digitalisierten Emissionsspektren wurde mit der Software FACSDiva™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellanalyse wurden als Häufigkeitsverteilung bzw. als Punktwolken-Diagramm wiedergegeben.

#### 2.4.2 Durchführung

Zur Untersuchung der isolierten, humanen mesenchymalen Fettstammzellen auf immunophänotypische Oberflächenmerkmale, sog. Cluster of Differentiation (CD), wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Als FACS-Analysegerät diente BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences), ausgestattet mit 3 Argonlasern der Wellenlängen 488 nm bis 650 nm. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte mit Grundfluoreszenzdetektoren im Wellenlängenbereich von 500 nm bis 650 nm.

In dieser Arbeit wurde eine Mehrfarben-Immunofluoreszenz mit Allophycocyanin (APC)-, Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE) -konjugierten

Antikörpern (BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenstellung der für die FACS-Analyse verwendeten Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorchrom
<b>CD31</b> Platelet endothelial cell-adhesion molecule (PECAM-1)	MEC13.3	Rat IgG2a	PE
<b>CD34</b> hämatopoetischer Stammzellmarker	RAM34	Rat IgG2a	PE
<b>CD44</b> Phagocytic glycoprotein-1 (PGP-1)	G44-26	Mouse IgG2b	FITC
<b>CD45</b> Leukocyte common antigen (LCA)	30-F11	Rat IgG2b	FITC
<b>CD73</b> Ecto-5'-nucleotidase (NT5E)	AD2	Mouse IgG1	PE
<b>CD90</b> Thymocyte-1 membrane glycoprotein (THY1)	5E10	Mouse IgG1	APC
<b>CD105</b> TGF-β1 receptor complex, Endoglin	MJ7/18	Rat IgG2a	FITC

Die mesenchymalen Fettstammzellen wurden, wie unter 2.3 beschrieben, bis Passage 2 kultiviert und zur Zellzahlbestimmung abgelöst. Für jede Probe, die mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt wurde, betrug die Anzahl der zu untersuchenden Zellen  $1 \times 10^5$ . Es erfolgte eine Verteilung der in DMEM suspendierten Zellzahl auf FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht), die anschließend bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert wurden. Die Trennung des Zellkugelchens von DMEM erfolgte durch Dekantieren des flüssigen Mediums, das anschließend durch eine Mischung aus 1 x PBS und 10%-igem FCS ersetzt wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation des in 1 ml dieser Mischung resuspendierten Zellkugelchens auf Eis. Die Antikörper wurden 1:100 mit einer 0,05%-igem Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) angereicherten 1 x PBS Lösung verdünnt. Das 1 x PBS/FCS Gemisch wurde dekantiert, das Zellkugelchen in 500 µl der 1:100 verdünnten Antikörper resuspendiert und für

eine Stunde auf Eis inkubiert. Pro Zellkugelchen wurden verschiedene Kombinationen der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern, bestehend aus PE CD31 und FITC CD44, PE CD34 und FITC CD45, APC CD90 und PE CD73, eingesetzt. Da der verwendete Oberflächenmarker CD105 nicht FITC-konjugiert war, wurde ein Zweitantikörper benötigt. Hierzu wurde das Zellkugelchen mit 1 x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert, die Flüssigkeit durch dekantieren entfernt und das Zellkugelchen in 500 µl des 1:100 verdünnten FITC-konjugierten Zweitantikörpers Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Salem, OR, USA) resuspendiert. Nach der durchgeführten Antikörper-Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation der FACS-Röhrchen, ein Waschschrift mit 1 x PBS und anschließend die Resuspension der Zellkugelchen in 500 µl FACS-Lösung (Cell-Wash, BD Biosciences). Als Negativkontrolle dienten mesenchymale Fettstammzellen ohne Antikörper-Inkubation. Vor jeder Messung des Vorwärtsstreuulichts, Seitwärtsstreuulichts und des Fluoreszenzsignals von 40.000 mesenchymalen Fettstammzellen erfolgte eine Vermischung der Probe durch vorsichtiges Verwirbeln mit einem Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz).

## **2.5 Multidifferenzierungspotential mesenchymaler Fettstammzellen**

In einer von Bunnell und Mitarbeitern durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe in der Lage sind, sich in mehrere mesenchymale Zelllinien zu differenzieren (Bunnell et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten mesenchymalen Fettstammzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, sich in Fett-, Knochen- und Knorpelgewebe zu differenzieren, untersucht. Die Versuche erfolgten mit mesenchymalen Fettstammzellen der Passage 3.

Die Expansion, das Ablösen der mesenchymalen Fettstammzellen und die Zellzahlbestimmung wurden wie bereits unter 2.3 beschrieben durchgeführt. Jeweils  $2 \times 10^4$  mesenchymale Fettstammzellen wurden in eine Vertiefung einer 4-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH) gegeben und mit 100 µl adipogenem oder osteogenem Differenzierungsmedium versorgt.

Dreidimensionale hochdichte Zellkugeln aus mesenchymalen Fettstammzellen wurden hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung untersucht.

### 2.5.1 Adipogene Differenzierung

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die mesenchymalen Fettstammzellen unter Zugabe eines adipogenen Differenzierungsmediums bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Jeden zweiten Tag erfolgte der Mediumwechsel. 1999 wurde die Zusammensetzung des hier verwendeten Differenzierungsmediums (s. Tabelle 2) beschrieben (Pittenger et al., 1999).

Tabelle 2: Adipogenes Differenzierungsmedium

Bestandteile des adipogenen Differenzierungsmediums	Endkonzentration
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	89%
FCS	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Dexamethason	1 µM
1-Methyl-3-Isobutylxanthin	500 µM
Indomethacin	100 µM
Insulin	1 µg/ml

Als Negativkontrolle dienten mesenchymale Fettstammzellen, die ebenfalls 14 Tage im Expansionsmedium kultiviert wurden. Nach 14 Tagen wurden die mesenchymalen Fettstammzellen direkt in den 4-Well-Platten durch Zugabe von 100 µl 4%-igem Paraformaldehyd (PFA, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) fixiert und anschließend angefärbt. Zum Nachweis der für Fettgewebe typischen intrazellulären Lipidvakuolen diente der Oil Red O-Farbstoff. Dieser Farbstoff gehört zu den fettlöslichen, rot färbenden Azofarbstoffen und wird zur Darstellung von Triglyceriden in Zellen verwendet.

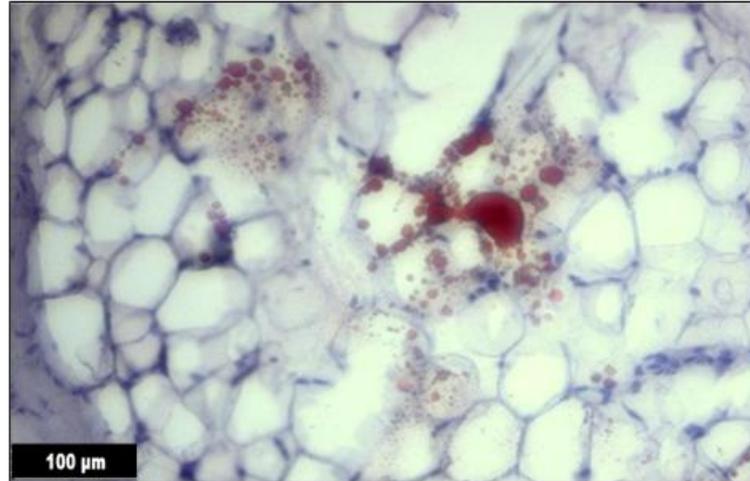


Abb. 3: Oil Red O-Färbung, humanes Bauchfettgewebe  
Vergleichsmaßstab: 100  $\mu\text{m}$

Zur Anfertigung einer 0,5%-igen Oil Red O-Stammlösung wurden 0,5 g Oil Red O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 100 ml Propylenglycol bei 95°C unter Rühren gelöst und anschließend filtriert. Nach drei Waschschritten mit destilliertem Wasser folgte das Beträufeln der Zellen mit 100%-igem Propylenglycol für 5 min, das anschließend durch die 60°C warme Oil Red O-Färbelösung ersetzt wurde. Nach 10-minütigem Anfärben der adipogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen in einem 60°C Inkubator wurden diese mit 85%-igem Propylenglycol (85 ml Propylenglycol, 15 ml destilliertes Wasser) beträufelt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers-Hematoxylinlösung für 30 s. Unter dem Mikroskop erschienen die Lipide rot und die Zellkerne blau gefärbt (s. Abb. 3).

### 2.5.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Fettstammzellen in 4-Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH) erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen. Das ebenfalls nach dem Protokoll von Pittenger und Mitarbeitern (1999) erstellte osteogene Differenzierungsmedium (s. Tabelle 3) wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Tabelle 3: Osteogenes Differenzierungsmedium

Bestandteile des osteogenen Differenzierungsmediums	Endkonzentration
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	89%
FCS	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Dexamethason	100 nM
$\beta$ -Glycerophosphat	10 mM
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	50 $\mu$ g/ml

Nach Fixierung der mesenchymalen Fettstammzellen mit 100  $\mu$ l 4%-igem Paraformaldehyd erfolgte der histologische Nachweis der für Knochen typischen Kalziumablagerungen in der Extrazellulärmatrix durch die von Kossa- und Alizarinrot-Färbung.

Bei der von Kossa-Färbung reagiert die verwendete Silbernitrat-Lösung mit kalziumphosphathaltigen Verbindungen des Gewebes. Durch die Einwirkung von UV-Licht werden braun-schwarz gefärbte Kalziumablagerungen sichtbar. Die Zellkerne werden mit Kernechtrot gegengefärbt (Mulisch et al., 2010). Die extrazellulären Kalziumablagerungen im Knochengewebe erschienen schwarz-braun und die Zellkerne rötlich (s. Abb. 4).

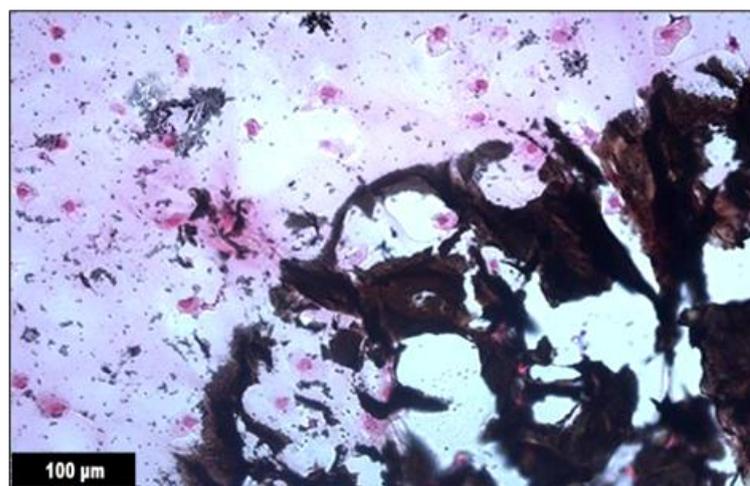


Abb. 4: Von Kossa-Färbung, humaner Röhrenknochen  
Vergleichsmaßstab: 100  $\mu$ m

Die mit 4%-igem Paraformaldehyd fixierten, osteogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen wurden mit einer 1%-igen Silbernitratlö-

sung ( $\text{AgNO}_3$ ) bedeckt und unter UV-Licht 30 min inkubiert. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser erfolgte die fünfminütige Fixierung mit 5%-igem Natriumthiosulfat und schließlich die Gegenfärbung der Zellkerne für 3 min mit 0,1%-igem Kernechtrot. Für die Herstellung der 0,1%-igen Kernechtrot-Färbelösung wurden 5 g Aluminiumsulfat (Merck) in 100 ml heißem destilliertem Wasser gelöst und 0,1 g Kernechtrot (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) beigemischt. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die gefärbten osteogen differenzierten Fettstammzellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100%) für 2 min dehydriert.

Der in der Natur vorkommende Alizarinrot-Farbstoff aus der Gruppe der Anthrachinone reagiert mit Kalziumverbindungen und färbt diese mineralisierten Areale rot an (Mulisch et al., 2010) (s. Abb. 5).

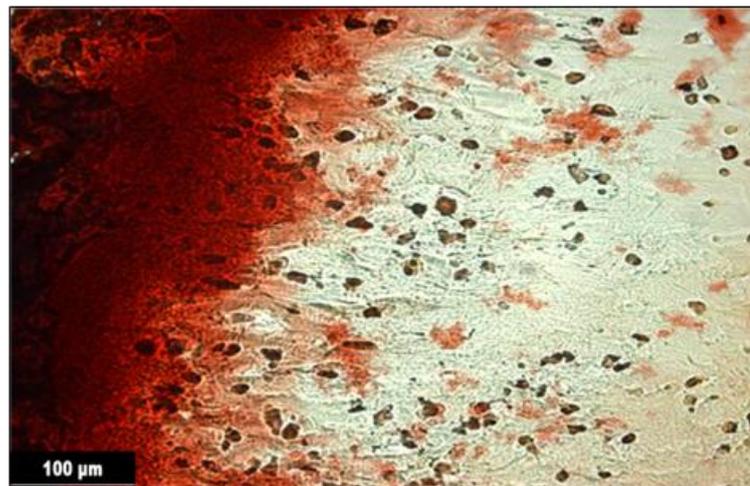


Abb. 5: Alizarinrot-Färbung, humaner Röhrenknochen  
Vergleichsmaßstab: 100  $\mu\text{m}$

Die mit 4%-igem Paraformaldehyd fixierten osteogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen wurden mit 1 x PBS für 5 min rehydriert. Nach der fünfminütigen Färbung der osteogen differenzierten, mesenchymalen Fettstammzellen mit der Alizarinrot-Färbelösung wurde die überschüssige Alizarinrot-Färbelösung abgesaugt.

### 2.5.3 Chondrogene Differenzierung

Nach dem Ablösen der mesenchymalen Fettstammzellen und Zellzahlbestimmung wurden aus der Zellsuspension jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen in einem 15 ml Falconröhrchen bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren

bildete sich am Boden des Falconröhrchens ein hochdichtes dreidimensionales Zellkugelchen, das mit 1 ml chondrogenem Differenzierungsmedium bedeckt und für 14 Tage im Brutschrank kultiviert wurde. Das Differenzierungsmedium (s. Tabelle 4, Tabelle 5) wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Tabelle 4: Chondrogenes Differenzierungsmedium

Bestandteile des chondrogenen Differenzierungsmediums	Endkonzentration
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	99%
Penicillin/Streptomycin	1%
Dexamethason	0,1 $\mu$ M
ITS <sup>+</sup> 1 (Insulin, Transferrin, Selen)	1%
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	50 $\mu$ g/ml
L-Prolin	40 $\mu$ g/ml
Pyruvat	100 $\mu$ g/ml

Tabelle 5: Verwendete Wachstumsfaktoren

Kombination der Wachstumsfaktoren	Endkonzentration
Bone morphogenetic Protein-6 BMP-6	500 ng/ml
Transforming growth Factor- $\beta$ 3 TGF- $\beta$ 3	50 ng/ml

Nach 14 Tagen erfolgte über Nacht die Fixierung des hochdichten Zellkugelchens mit 4%-igem Paraformaldehyd. Für die Anfertigung von 12  $\mu$ m Gefrierschnitten wurden die fixierten hochdichten Zellkugelchen mit 30%-iger Glukose (Merck) bedeckt und nach 24 Stunden in quadratische Cryomolds (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) überführt, mit Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek Europe B.V.) eingebettet und bei -20°C eingefroren. Die Bildung extrazellulärer Knorpelmatrix wurde mit der Alzianblau-Färbung überprüft (s. 2.11.1).

## 2.6 Polyurethan als Trägermaterial

### 2.6.1 Eigenschaften von Polyurethan

PolyMaterials (Creative polymer technologies, Kaufbeuren) stellte freundlicherweise das in dieser Arbeit verwendete Polyurethan (AP1970D) zur Verfügung. Bei dem verwendeten Material handelte es sich um einen offenporigen, hydrophilen und bioabbaubaren Polyurethanschaum aus den Bestandteilen Polycaprolactondiol und -triol, Poly(ethylenglykol)-*block*-Poly(propylenglykol)-*block*-Poly(ethylenglykol) (PEG-PPG-PEG), Dextrose und Triethanolamin (Wiese et al., 2006).

### 2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Analyse der Oberflächenbeschaffenheit und der Interkonnektivität der Poren des verwendeten Polyurethanschaumes (PU, AP1970D, polyMaterials) wurden aus dem Polyurethanschaum zylinderförmige Konstrukte mit 5 mm Durchmesser und 2 mm Höhe herausgestanzt und für die Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet.

Die Betrachtung und Fotodokumentation der Proben erfolgte in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg, in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Krohne, mit einem Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss vom Typ DSM 940 bei 100- bis 1000-facher Vergrößerung.

### 2.6.3 Herstellung von Polyurethan-Fibrin-Konstrukten

Die 2012 von polyMaterials hergestellten zylinderförmigen Polyurethanschäume, abgekürzt PU, mit einem Durchmesser von 7 cm und einer Höhe von 2 cm wurden mit einer Schere geviertelt, in flüssigen Stickstoff getaucht, um anschließend Konstrukte mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 2 mm herauszustanzen (Biopsie-Stanze Ø5 mm, Harris Uni-Core™, Redding, CA, USA) (s. Abb. 6).



Abb. 6: Herstellung der Polyurethan-Konstrukte,  $\varnothing$  5 mm, Höhe 2 mm

Für die weitere Verwendung des ausgestanzten Polyurethanschaumes als Trägermaterial für die Zellkultur erfolgten mehrere Waschschriffe in 70%-igem Ethanol und 1 x PBS, bevor die Konstrukte in mit 50 ml 1 x PBS gefüllten Schott-Glasflaschen autoklaviert wurden.

In der vorliegenden Arbeit kam als Trägermaterial eine Kombination aus Polyurethanschaum und Fibrin-Hydrogel, ein sog. Polyurethan-Fibrin-Konstrukt, zum Einsatz. Die Vorgehensweise bei der Herstellung des langzeitstabilen Fibrin-Hydrogels erfolgte nach dem Protokoll von Eyrich und Mitarbeitern (Eyrich et al., 2007a).

Für die Herstellung einer Aprotinin-Lösung wurden 3000 KIE Aprotinin (Baxter GmbH, Unterschleissheim) in 6 ml destilliertem Wasser gelöst. 1 ml dieser Aprotinin-Lösung wurde anschließend mit 100 mg bovinem Fibrinogen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) vermischt, in eine 2 ml Spritze gefüllt und durch einen 45  $\mu$ m sterilen Filter (Filtropour, Sarstedt) gepresst. Für die benötigte Thrombin-S-Lösung wurden 500 i.E Thrombin in 1 ml 40 mM Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) gelöst. Jeweils  $1 \times 10^6$  der abgelösten mesenchymalen Fettstammzellen wurden in 20  $\mu$ l der Thrombin-S Lösung resuspendiert. In den Vertiefungen einer 96-Well-Platte wurden jeweils 20  $\mu$ l der in Thrombin-S resuspendierten mesenchymalen Fettstammzellen und 20  $\mu$ l des sterilen Aprotinin-Fibrinogen-Gemisches durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Anschließend erfolgte die Entnahme der sterilen Polyurethanschäume aus der autoklavierten Glasflasche.

Nach vorsichtigem Trockentupfen der Polyurethanschäume mit steriler Gaze wurden diese in die mit 40 µl Fibrin gefüllten Vertiefungen der 96-Well-Platte getaucht, bis sie die Lösung vollständig aufgesogen hatten. Anschließend erfolgte für 45 min im Brutschrank bei 37°C die Inkubation der mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte. Hatte das Fibrin die gewünschte Konsistenz angenommen, wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte mit einer sterilen Pinzette aus der 96-Well-Platte in eine 48-Well-Platte überführt und mit jeweils 700 µl chondrogenem Differenzierungsmedium bedeckt.

#### 2.6.4 Chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten

Für die unterschiedlichen Versuchsansätze, mesenchymale Fettstammzellen im Polyurethan-Fibrin-Konstrukt chondrogen zu differenzieren, wurde ein eigenständig zusammengestelltes Differenzierungsmedium mit unterschiedlichen Kombinationen von Wachstumsfaktoren angereichert (s. Tabelle 4). In der Kontrollgruppe erfolgte die Kultivierung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte im Expansionsmedium.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wachstumsfaktoren Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6), Transforming growth factor-β3 (TGF-β3) und Insulin growth factor-I (IGF-I) in erhöhten Konzentrationen und in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt (s. Tabelle 6).

Zur vorteilhafteren Lesbarkeit werden im Folgenden die nachstehenden Abkürzungen für die eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen verwendet:

- Polyurethan-Fibrin-Konstrukte im Expansionsmedium, als Kontrollgruppe (**DMEM**)
- Chondrogene Differenzierung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte durch Zugabe von BMP-6 für 7 Tage, für die restliche Differenzierung Zugabe der Wachstumsfaktorkombination BMP-6 und TGF-β3 (**1B2B+T**)
- Chondrogene Differenzierung durch die Wachstumsfaktorkombination BMP-6 und TGF-β3 (**B+T**)

- Chondrogene Differenzierung durch die Wachstumsfaktorkombination IGF-I und TGF- $\beta$ 3 (I+T).

Tabelle 6: Verwendete Wachstumsfaktoren

Kombinationen der Wachstumsfaktoren	Endkonzentration
7 Tage BMP-6	500 ng/ml
weitere 7 Tage bzw. 14 Tage BMP-6	500 ng/ml
TGF- $\beta$ 3	50 ng /ml
TGF- $\beta$ 3	50 ng/ml
BMP-6	500 ng/ml
TGF- $\beta$ 3	50 ng/ml
IGF-I	100 ng/ml

Für jeden Versuchsansatz benötigte man zur Besiedelung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte  $32 \times 10^6$  mesenchymale Fettstammzellen. Während eines Zeitraums von 14 und 21 Tagen erfolgte die Kultivierung der besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in 48-Well-Platten unter der Zugabe von 700  $\mu$ l des jeweiligen chondrogenen Differenzierungsmediums in einem Brutschrank (CO<sub>2</sub> Inkubator NU5500E, NuAire Inc.) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit (s. Abb. 7). Für molekularbiologische, biochemische und histologische Untersuchungen wurden für Tag 14 drei und für Tag 21 vier Polyurethan-Fibrin-Konstrukte besiedelt und kultiviert. Um die Kontaminationsgefahr möglichst gering zu halten, wurde zwischen den einzelnen Konstrukten in den unterschiedlichen Medien immer eine Reihe frei gelassen und ein Konstrukt als Reserve kultiviert.



Abb. 7: Vertiefungen einer 48-Well-Platte, gefüllt mit 700  $\mu$ l chondrogenem Differenzierungsmedium. Am Boden der Vertiefungen befinden sich die mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte.

## 2.7 RNA-Isolierung

### 2.7.1 Grundlagen

Mit einer sterilen Pinzette wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 14 und Tag 21 der chondrogenen Differenzierung aus der 48-Well-Platte entnommen, mit 1 x PBS gewaschen und anschließend zur Stabilisierung der Ribonukleinsäure, abgekürzt RNA, mit 1 ml RNAlater® (Ambion, Austin, TX, USA) bedeckt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Humaner Nasenseptumknorpel, welcher im Rahmen elektiver Eingriffe in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen) entnommen wurde, diente als Positivkontrolle. Nach einem Waschschrift mit 1 x PBS erfolgte die Konservierung des Nasenseptumknorpels in 1 ml RNAlater® bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Die RNA-Isolierung aus den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten und dem Nasenseptumknorpel erfolgte mit dem Qiagen RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Das von Qiagen entwickelte System nutzt die Fähigkeit der RNA, sich an mit Silikat beschichteten Membranen zu binden und die Geschwindigkeit der Microspinttechnologie zur Isolierung von RNA in speziell dafür vorgesehenen Säulen. In mehreren Waschschrift mit Waschlösungen hoher Salzkonzentra-

tion wird die gebundene RNA gereinigt und durch Zugabe von RNase-freiem Wasser aus der Membran herausgelöst. Die Abkürzungen für die aus dem Qiagen RNeasy® Mini Kit verwendeten Lyse- und Waschpuffer RLT, RWI und RPE stammen vom Hersteller Qiagen und wurden bereits von weiteren Arbeitsgruppen zur RNA-Isolierung verwendet (Brodkin et al., 2004, Wang et al., 2006).

### 2.7.2 Durchführung

Der durch einen sterilen Mörser zerkleinerte Nasenseptumknorpel und die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden für 12 h bei 37°C im Brutschrank durch Zugabe von 350 µl RLT-Lyse-Puffer (Qiagen GmbH) lysiert. Durch das in dem RLT-Lyse-Puffer enthaltene Guanidium Isothiocyanat wurden RNAsen inaktiviert. Die 350 µl des lysierten Zellmaterials samt Polyurethanschaum wurden zum Homogenisieren in eine Qiashreder Säule (Qiagen GmbH) pipettiert und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch die Zugabe von 350 µl 70%-igem Ethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zu dem Lysat wurden optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silikatmembran geschaffen. Das Lysat wurde mit Ethanol vermischt, in eine RNeasy® Spin Säule (Qiagen GmbH) pipettiert und anschließend bei 13.000 rpm für 15 s zentrifugiert. Da die RNA sich an die Silikatmembran der RNeasy® Spin Säule anheftete, konnte in den folgenden Schritten das Lysat der Waschschriffe entsorgt werden. Für die Reinigung der RNA erfolgten drei Waschschriffe. 700 µl des RWI-Puffers (Qiagen GmbH) wurden auf die Membran der RNeasy® Spin Säule pipettiert und anschließend bei 13.000 rpm für 15 s zentrifugiert. In zwei Waschschriffen hintereinander wurden 500 µl des mit 100%-igem Ethanol vermischten RPE-Puffers (Qiagen GmbH) auf die Membran pipettiert und zuerst 15 s, anschließend 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Herauslösen der RNA erfolgte durch Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 1 min. Die in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt) aufgefangene RNA konnte bei -20°C gelagert werden.

## 2.8 cDNA-Synthese und Amplifikation mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

### 2.8.1 c-DNA Synthese

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion, abgekürzt RT-PCR, benötigt man als Ausgangsmaterial komplementäre Desoxyribonukleinsäure, abgekürzt cDNA. Die Sequenzabfolge der isolierten einsträngigen RNA diene als Vorlage für die Transkription in cDNA. Durch das freie 3'-OH Ende eines Oligo-dT-Primers, das sich komplementär an die einsträngige RNA bindet, wird der Startpunkt der cDNA Synthese festgelegt. Die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, lagert sich an den Primer an und katalysiert die Synthese des komplementären DNA-Stranges (Mülhardt, 2009).

Für die cDNA Synthese wurde in dieser Arbeit ein bereits mit Reverse Transkriptase vorgemischter SuperScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen®, life technologies™ GmbH) verwendet. 4 µl der aus Polyurethan-Fibrin-Konstrukten oder Nasenseptumknorpel isolierten Gesamt-RNA wurden mit 12 µl RNase-freiem Wasser und 4 µl Master Mix (SuperScript® VILO™ Master Mix, Invitrogen®, life technologies™ GmbH) in einem 1,5 ml sterilen Reaktionsgefäß gemischt und auf Eis gekühlt. In jeweils acht nebeneinander angeordneten speziellen Reaktionsgefäßen (Fast Reaction Tubes, Micro Amp 8 Cap strips, Invitrogen®, life technologies™ GmbH) wurden 20 µl des verdünnten Master-Mix-RNA-Gemisches überführt und die Gefäße mit passenden Deckeln verschlossen. Für die cDNA-Synthese erfolgte eine Programmierung des Step-One™ Real-Time PCR Systems (Invitrogen®, life technologies™ GmbH) nach dem vom Hersteller empfohlenen Schema. Als erstes wurde die RNA 10 min bei 25°C denaturiert, anschließend erfolgte die cDNA-Synthese für 60 min bei 42°C. Durch eine Erhitzung auf 85°C während 5 min wurde die cDNA-Synthese durch Denaturierung der Reversen Transkriptase gestoppt.

Jeweils 3 µl der frisch synthetisierten cDNA zusammen mit 147 µl RNase-freiem Wasser wurden in Photoküvetten (Eppendorf Uvette, Eppendorf AG) pipettiert und mit einem Eppendorf BIO Photometer (Eppendorf AG) die cDNA-Konzentration bestimmt. Um die einzelnen Proben miteinander vergleichen zu

können, wurde die synthetisierte cDNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Gesamtkonzentration von 50 ng/ml verdünnt.

### 2.8.2 Grundlagen der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, abgekürzt PCR, ermöglicht eine Nachahmung der natürlichen, im Zellkern stattfindenden DNA-Replikation *in vitro*. Ausgehend von einem DNA-Einzelstrang, genannt Matrize, und einem Oligonukleotid, genannt Primer, ermöglichen die Eigenschaften von hitzestabilen DNA-Polymerasen die Synthese eines neuen komplementären DNA-Stranges. Bei dieser Methode zur Vervielfältigung der DNA wiederholen sich in mehreren Zyklen hintereinander 3 Reaktionsschritte. Ein Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion beginnt mit der Auftrennung, genannt Denaturierung, der doppelsträngigen DNA bei 94°C. Nach Abkühlung auf 55°C kann die Anlagerung, genannt Annealing, eines gegenläufigen komplementären Primers an die einzelsträngigen DNA-Moleküle stattfinden. Die Primer dienen der hitzestabilen DNA-Polymerase als Startpunkt zur Verlängerung der Nukleinsäuresequenzen. Auf die Erhöhung der Temperatur bis 72°C reagiert die DNA-Polymerase mit der Synthese eines Zweitstranges. Am Ende eines Zyklus erhält man zwei DNA-Doppelstränge, die in den folgenden Zyklen als Vorlagen für die Vervielfältigung, auch als Amplifikation bezeichnet, der DNA dienen. Durch eine Wiederholung von 40 Zyklen erhält man eine exponentielle Vervielfältigung der Nukleinsäuresequenzen (Mülhardt, 2009).

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der oben beschriebenen Vervielfältigungsmethode der DNA und ermöglicht zusätzlich durch Fluoreszenz-Messung eine Quantifizierung der vervielfältigten DNA. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt durch die Verwendung einer Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten, sequenzspezifischen TaqMan™-Sonde. Die TaqMan™-Sonde ist ein Primer, der an einem Ende mit einem Reporter- und am anderen Ende mit einem Quencher-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Bei intakter TaqMan™-Sonde wird die Fluoreszenz des Reporters durch die des Quenchers unterdrückt. Während der Polymerase-Kettenreaktion lagert sich die TaqMan™-Sonde an einen komplementären DNA-Strang an und die DNA-Polymerase beginnt mit der Elongation. Durch die Exonucleaseaktivität der DNA-Polymerase wird die TaqMan™-Sonde abgebaut und die Fluoreszenz des abgespaltenen

Reporters detektiert. Hierbei ist die Fluoreszenz proportional zu der durch die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigten DNA (Holzapfel et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur relativen Quantifizierung der vervielfältigten DNA die CT-Werte analysiert. Der CT-Wert beschreibt hierbei den Zyklus, an dem die ermittelte Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, also ein festgelegter Schwellenwert überschritten wird. Nach den ersten Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion ist die Ausbeute der vervielfältigten DNA noch gering. Nach 40 Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion ist die Menge der vervielfältigten DNA rapide angestiegen, so dass die Vervielfältigung langsam aufhört. Zwischen diesen zwei Phasen liegt eine exponentielle Phase, in der optimale Bedingungen für die Vervielfältigung der DNA vorliegen. Zu Beginn der exponentiellen Phase übertrifft die detektierte Fluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz. Der sog. CT-Wert wird durch die Software des Analysegerätes (Step-One™ Real-Time PCR, Invitrogen®, life technologies™) registriert (s. Abb. 8).

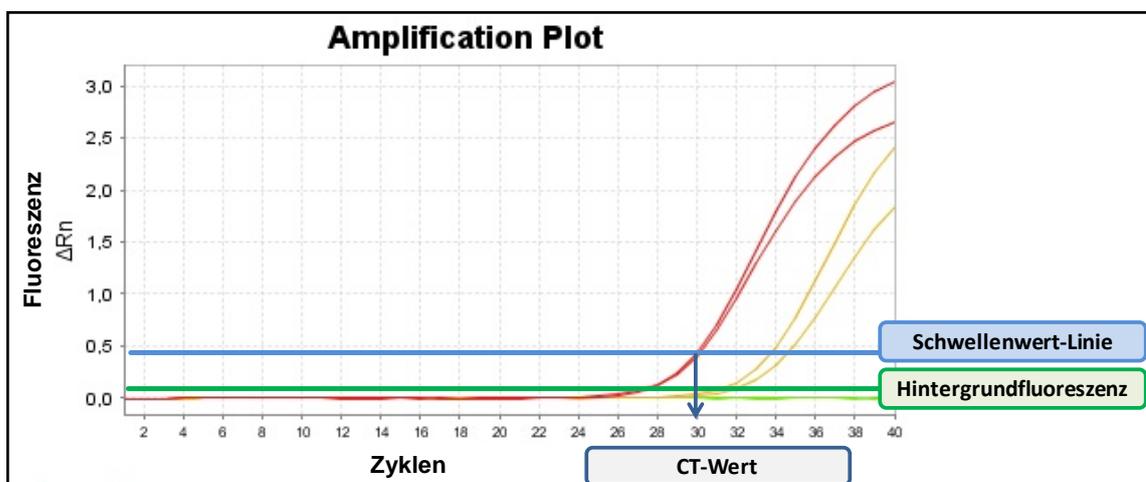


Abb. 8: Darstellung einer Amplifikationskurve von humanem Nasenseptumknorpel. Die Fluoreszenz wird auf der y-Achse gegen die Zyklenzahl auf der x-Achse aufgetragen. Die Schwellenwertlinie zeigt die detektierte Fluoreszenz an, die die Hintergrundfluoreszenz erstmalig übertrifft. Auf der x-Achse wird der Schwellenwert-Zyklus, der sog. CT-Wert abgelesen.

Die relative Quantifizierung wurde statistisch anhand der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, bezogen auf GAPDH und humanem Nasenseptumknorpel durchgeführt.

### 2.8.3 Durchführung

Für die Analyse der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte hinsichtlich der Genexpression knorpelspezifischer Marker-Gene wurden in der vorliegenden Arbeit TaqMan™ Gene Expression Assays (Invitrogen®, life technologies™ GmbH) mit den in Tabelle 7 aufgelisteten spezifischen Primer-Sequenzen verwendet. Für jede durchgeführte Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion stellten humaner Nasenseptumknorpel die Positivkontrolle, steriles destilliertes Wasser die Negativkontrolle und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) die endogene Kontrolle dar.

Tabelle 7: Verwendete Primer für die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Gename	Gensymbol	Basenpaare (bp)
Aggrekan	ACAN	145 bp
Kollagen Typ 1, alpha 1	COL1A1	66 bp
Kollagen Typ 2a, alpha 1	COL2A1	65 bp
Kollagen Typ 9, alpha 2	COL9a	65 bp
Kollagen Typ 10, alpha 1	COL10a	66 bp
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	GAPDH	122 bp
Sex determining region Y-box9	SOX9	102 bp

In sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden zunächst 5 µl des TaqMan® Gene Expression Master Mix (enthält AmpliTaq Gold®, DNA-Polymerase, Desoxyuridintriphosphat (dUTP), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) Uracil-DNA Glycosylase (UDG), passive ROX™-Referenz; Invitrogen®, life technologies™ GmbH) mit 2,5 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und anschließend mit 0,5 µl TaqMan® Primer vermischt. In die Vertiefungen einer 96-Well-Platte (Micro Amp Fastoptical 96-Well Plate, Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH) wurden zuerst 8 µl der Master-Mix-Primer-Mischung vorgelegt und jeweils 2 µl der verdünnten cDNA dazu gegeben. Von jeder Probe wurden Duplikate erstellt. Die mit einer Klebefolie (optisch klar, RNase-DNase frei, Sarstedt)

abgedeckte 96-Well-Platte wurde für die Durchführung der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion in das Analysegerät gesetzt und das Step-One™ Real-Time PCR System (Invitrogen®, life technologies™ GmbH) nach Herstellerangaben programmiert (s. Abb. 9).

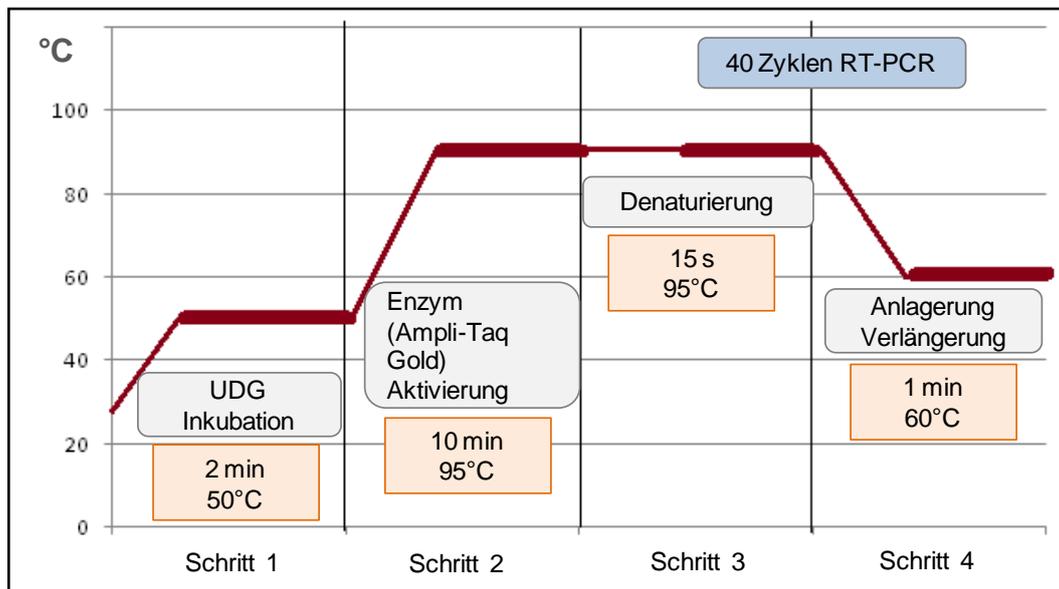


Abb. 9: Programmierung des Step-One™ Real-Time-PCR Systems  
Darstellung der verwendeten Schmelzkurve. Im 1. Schritt wird die DNA mit einer Uracil-DNA-Glycosylase inkubiert. Im Schritt 2 wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C die Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase aktiviert. Im Schritt 3 findet die Denaturierung der doppelsträngigen DNA statt. Nach einer Abkühlung auf 60°C im Schritt 4 lagert sich der komplementäre Primer an die einzelsträngige DNA an und die DNA-Polymerase synthetisiert einen Zweitstrang. Innerhalb 40 RT-PCR Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

## 2.9 Biochemische Analyse

### 2.9.1 Papain-Gewebeverdau

Aus dem Milchsafte (Latex) unreifer Papaya-Früchte können drei verschiedene Cystein-Proteinasen extrahiert werden. Durch die Proteinasen Papain, Chymopapain und Papaya-Proteinase III ist es möglich, Gewebestrukturen proteolytisch aufzuspalten (Zucker et al., 1985). Die Eigenschaft der Proteinase Papain (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Proteine biochemisch abzubauen, wurde für den Gewebeverdau der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte an den Tagen 0, 14, 21, genutzt. Zunächst wurden zur Herstellung eines L-Cystein-Puffers 302 mg L-Cystein (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH) in 200 ml sterilen 1 x PBS gelöst, 5 ml 0,5 mM EDTA dazu pipettiert und unter Zugabe von HCl ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Mit diesem L-Cysteinpuffer wurde eine Papain-Stammlösung mit

einer Endkonzentration von 1,25 mg Papain/ml L-Cystein hergestellt. Für den Gewebeverdau erfolgte durch erneute Zugabe von L-Cysteinpuffer eine Verdünnung der Papain-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 125 µg Papain/ml L-Cysteinpuffer. In sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in 1 ml dieser Papain-Gebrauchslösung für 20 h bei 60°C im Thermoschüttler (Schüttelinkubator, Thermomixer comfort, Eppendorf AG) verdaut. Nach zwanzigstündiger Inkubation bei 60°C wurden die Reaktionsgefäße 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 666 µl des Überstandes für die biochemische Analyse des Glykosaminoglykan- und Kollagen-Gehalts in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anhand der restlichen 333 µl erfolgte durch eine Natriumacetat-Fällung die DNA-Bestimmung.

### 2.9.2 DNA-Gehalt

Um die genomische DNA von Proteinen, Salzen und Enzymen zu reinigen, wurden 333 µl des Gewebeextraktes mit den organischen Lösungsmitteln, Chloroform und Phenol, vermischt und anschließend eine Natriumacetat-Fällung durchgeführt. Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (alle, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurden in Anteilen von 25:24:1 vermischt und in einer dunklen Schott-Flasche bei 4°C gelagert. Durch Zugabe von 333 µl der Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Mischung zu den 333 µl des Gewebeextraktes in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß und nach anschließender Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 min fand eine Phasentrennung statt. Insgesamt waren 3 Phasen zu erkennen. Verunreinigungen des Gewebeextraktes mit hydrophoben Eigenschaften bildeten sich am Boden des Reaktionsgefäßes in der organischen Phase. Die durch Phenol denaturierten Proteine sammelten sich in der Interphase an. In der Oberphase befand sich die hydrophile DNA. Nach der Überführung der wässrigen Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß wurden 33 µl 3M Natriumacetat (Merck) und 666 µl 100%-iges Ethanol dazu pipettiert. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes fand eine Vermischung der gelösten und gereinigten DNA mit Ethanol und Natriumacetat statt. Bei -20°C erfolgte durch Ethanol und Natriumacetat die Ausfällung der DNA aus der wässrigen Oberphase. Nach 20 h war am Boden des Reaktionsgefäßes die ausgefällte DNA zu erkennen. Für die anschließende Lösung dieser DNA wurde ein aus

100 mM NaCl, 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck) und 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bestehender TEN-Puffer hergestellt. Durch Lösung der DNA in 200 µl TEN-Puffer konnte anschließend der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt werden (Eppendorf BIO Photometer, Eppendorf AG).

### 2.9.3 Glykosaminoglykan-Gehalt

Die von Chondrozyten produzierte Extrazellulärmatrix setzt sich aus unterschiedlichen Komponenten zusammen. Zu den Hauptbestandteilen von Knorpel zählen Proteoglykane. Das sind Proteine mit kovalent gebundenen Polysacharidketten, sog. Glykosaminoglykane. Der Farbstoff 1,9-Dimethylmethylen-Blau, abgekürzt DMB, bindet sich aufgrund seiner positiven Ladung an die negativ geladenen Glykosaminoglykane, bestehend aus Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat, Keratansulfat. Durch die Anfärbung mit 1,9-Dimethylmethylen-Blau kann durch eine spektrometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 625 nm der Glykosaminoglykan-Gehalt von Knorpel quantifiziert werden (Dey et al., 1992, Farndale et al., 1981). Für die Quantifizierung von sulfatierten Polysacchariden, Chondroitin-4 und -6-Sulfat sowie Keratansulfat in der Extrazellulärmatrix von chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukten und humanem Nasenseptumknorpel wurde in dieser Arbeit der Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, Carrickfergus, Großbritannien) verwendet. Aus Chondroitin-4-Sulfat, isoliert aus boviner Trachea (Blyscan™ Glykosaminoglykan Standard 100 µg/ml, Biocolor) und sterilem destillierten Wasser wurde eine Glykosaminoglykan-Standardreihe mit linear ansteigender Konzentration hergestellt. Jeweils 100 µl der einzelnen Konzentrationen der Glykosaminoglykan-Standardreihe und 100 µl des durch Papain gewonnenen Gewebesextraktes wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 1 ml der Blyscan™ Färbelösung (Blyscan™ Glycosaminoglykan Dye Reagent (1,9-Dimethylmethylen-Blau)) vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf einem Schüttler wurden die Reaktionsgefäße bei 12.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren waren am Boden der Reaktionsgefäße unterschiedlich große bläulich angefärbte Kügelchen zu erkennen. Die blaue Färbelösung wurde abpipettiert und der von den Kügelchen gebundene 1,9-Dimethylmethylen-Blau-Farbstoff durch die Zugabe von 500 µl Dissoziierungsreagenz (Blyscan Glycosaminoglykan Disso-

ciation Reagent, 1-Propanol, chaotropes Salz) herausgelöst. Durch Verwirbelung der Kügelchen in den Reaktionsgefäßen wurden diese aufgelöst und das Dissoziierungsreagenz färbte sich blau an. In eine 96-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH) wurden je Vertiefung 200 µl dieser Lösung pipettiert. Von jedem Standard und von jeder Probe wurden Duplikate erstellt. Mit einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan® Plus Microplate Reader, Lab systems, Helsinki, Finnland) und einem Farbfilter von 620 nm konnte der Glykosaminoglykangehalt der Proben durch spektrometrische Analyse der unterschiedlichen Blaufärbung quantifiziert werden.

#### 2.9.4 Kollagen-Gehalt

In der Extrazellulärmatrix des Knorpels können nicht nur Wasseranteile und Proteoglykane nachgewiesen werden, sondern auch das Strukturprotein Kollagen. Die Polypeptidketten des Kollagens bestehen aus repetitiven Aminosäuresequenzen, wie Glycin, Prolin und Hydroxyprolin, die sich in einer  $\alpha_1$ -Kette anordnen. Drei dieser  $\alpha_1$ -Ketten sind in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden. Picro-Sirius Red F3 BA ist ein anionischer Farbstoff mit Sulfonsäure-Seitenketten, die sich an Aminosäuren des Kollagens anlagern. Bedingt durch diese spezifische Affinität richtet sich der Picro-Sirius Red-Farbstoff parallel zu der Tripelhelix des Kollagens aus und färbt diese rot an (Junqueira et al., 1979, Puchtler et al., 1988). Für den Nachweis des Kollagen-Gehalts in der Extrazellulärmatrix der chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurde ein spektrometrischer Nachweis der erfolgten Picro-Sirius Red-Färbung mit dem Sircol™ Soluble Collagen Assay (Biocolor) durchgeführt. Aus der Standard-Lösung (Sircol™ Collagen Standard 0,5 mg/ml) und sterilem destillierten Wasser wurde eine Standardreihe linear ansteigender Konzentration hergestellt. Je 100 µl der einzelnen Standardkonzentrationen und je 100 µl des Gewebeeextraktes wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Sircol™-Färbelösung (Sircol Collagen Dye Reagent, Picro-Sirius Red) vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf einem Schüttler und anschließender Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 min waren am Boden der Reaktionsgefäße rote Kügelchen unterschiedlicher Größe zu erkennen. Die Picro-Sirius Red-Färbelösung wurde abpipettiert und die Kügelchen mit eiskalter Waschlösung (Sircol™ Collagen Acid Salt Wash Reagent) bedeckt. Nach erneutem Zentrifugieren bei

12.000 rpm für 10 min wurde die Waschlösung abpipettiert und die Kügelchen in 250 µl alkalischer Lösung (Sircol™ Collagen Alkali Reagent) resuspendiert. Durch Verwirbelung wurden die Kügelchen vollständig aufgelöst und die alkalische Lösung färbte sich unterschiedlich rot an. Jeweils 200 µl dieser rötlich gefärbten Flüssigkeit wurden in die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert und der Kollagen-Gehalt der einzelnen Proben spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan® Plus Microplate Reader, Lab systems) bestimmt. Von jedem Standard und jeder Probe wurden Duplikate erstellt.

## **2.10 Herstellung histologischer Präparate**

### **2.10.1 Fixierung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte**

Nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung der mesenchymalen Fettstammzellen in der Polyurethan-Fibrin-Trägermatrix wurden die Konstrukte aus der 48-Well-Platte entnommen und für histologische und chromogene immunhistochemische Untersuchungen vorbereitet. Nach einem Waschschrift mit 1 x PBS wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in Rollrandgefäße (5 ml, A. Hartenstein Laborbedarf GmbH) überführt und die Gewebestrukturen mit 4%-igem Paraformaldehyd (Serva, Feinbiochemica) bei 4°C fixiert. Das 4%-ige Paraformaldehyd wurde nach 12 h durch einen Waschschrift mit 1 x PBS entfernt. Um das vollständige Eindringen zähflüssiger Konservierungssubstanzen in den zellbesiedelten Polyurethanschaum zu ermöglichen, erfolgte eine Beschichtung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte mit 30%-iger steriler Glukose-Lösung (Merck) und anschließend mit Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude) über einen Zeitraum von 14 Tagen auf einem Rüttler. Nach dieser 14-tägigen Inkubation wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in Tissue-Tek® O.C.T.™ gefüllte quadratische Vertiefungen, sog. Tissue Tek® Cryomolds®, überführt und bei -20°C eingefroren.

### **2.10.2 Gefrierschnitte**

Mit der Gefrierschneidemaschine Leica CM 1510 S (Leica, Wetzlar) wurden bei -25°C von den in Tissue-Tek® O.C.T.™ eingebetteten Polyurethan-Fibrin-Konstrukten 20 µm Gefrierschnitte angefertigt. Auf für Gefrierschnitte geeignete

spezielle Objektträger (SuperFrost® Plus, R. Langenbrinck, Emmerdingen) konnten nach jedem Schneidevorgang bis zu sieben Gefrierschnitte aufgezo- gen werden. Die dünnen Gefrierschnitte auf den Objektträgern wurden für 12 h getrocknet, um die histologischen Färbungen durchzuführen. Objektträger für die Durchführung der chromogenen Immunhistochemie wurden bei -20°C gela- gert. Vor jeder histologischen Färbung und chromogenen Immunhistochemie musste das Einbettmedium durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt werden. Die Gefrierschnitte auf den Objektträgern wurden durch Ace- ton/Methanol (Mischverhältnis 1:1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) unter dem Abzug für 10 min fixiert und anschließend für 30 min getrocknet.

## 2.11 Histologische Färbungen

### 2.11.1 Alzianblau-Färbung

Durch eine Alzianblau-Färbung können Glykosaminoglykane der extrazellulären Knorpelmatrix dargestellt werden. Der Alzianblau-Farbstoff ist positiv geladen und bindet sich an negativ geladene sulfatierte Polysaccharidketten, sog. Gly- kosaminoglykanketten der Proteoglykane (Lev et al., 1964). Da nur saure Poly- saccharide durch den Alzianblau-Farbstoff blau angefärbt werden, müssen die Zellkerne mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat rot gegengefärbt werden (s. Abb. 10).

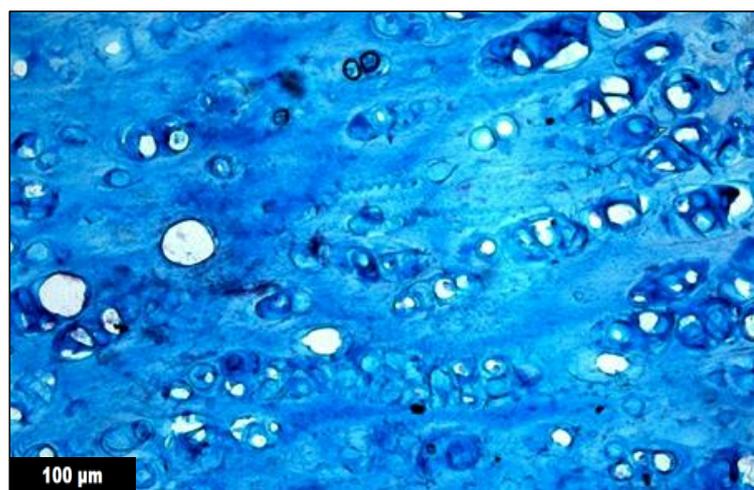


Abb. 10: Alzianblau-Färbung, humaner Nasenseptumknorpel  
Vergleichsmaßstab: 100 µm

Die Objektträger mit den Gefrierschnitten wurden für 3 min in eine Küvette mit 3%-iger Essigsäure (Mallinckrodtbaker B.V., Deventer, Niederlande) getaucht.

Nach Abtropfen der Essigsäure von den Objektträgern erfolgte für 45 min die Alzianblau-Färbung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) der Gefrierschnitte. Wegen der Wasserlöslichkeit des Alzianblau-Farbstoffs wurden die Gefrierschnitte nur kurz durch eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette gezogen. Anschließend erfolgte während 5 min die Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Merck). Nach einem erneuten Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Gefrierschnitte in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentration von 70%, 90% und 100% für 2 min dehydriert.

### 2.11.2 Safranin O-Färbung

Safranin O aus der Reihe der Safranine, sog. Azinfarbstoffe, ist ein wasserlöslicher, roter Farbstoff. Durch die positive Ladung des Safranin O-Farbstoffs bindet er sich ebenfalls an negativ geladene Glykosaminoglykanketten der Knorpelmatrix. Im Gegensatz zu den Färbepartikeln des Alzianblau-Farbstoffs sind die Partikel des Safranin O-Farbstoffs kleiner und können dadurch auch tiefer gelegene Gewebestrukturen anfärben. Die rote Farbintensität der angefärbten Extrazellulärmatrix verhält sich proportional zu dem Glykosaminoglykgehalt der Knorpelmatrix (Kiviranta et al., 1985). Da sich die Zellkerne durch die Safranin O-Färbung nicht darstellen lassen, müssen diese mit einer Kernfärbung gegengefärbt werden. In dieser Arbeit wurden die Zellkerne durch Eisenhämatoxylin nach Weigerts dunkelbraun angefärbt (s. Abb. 11).



Abb. 11: Safranin O-Färbung, humaner Nasenseptumknorpel  
Vergleichsmaßstab: 100 μm

Nach Rehydrierung der Gefrierschnitte in destilliertem Wasser erfolgte für 5 min die Färbung der Zellkerne mit Eisenhämatoxylin (Merck). Die Gefrierschnitte

wurden in eine Küvette mit destilliertem Wasser getaucht und anschließend erfolgte das Ausspülen des Farbstoffes für 10 min unter Leitungswasser. In einer mit Safranin O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gefüllten Küvette erfolgte für 10 min die Färbung der Gefrierschnitte und nach einem weiteren Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden sie zuerst in 90%-igem, danach in 100%-igem Ethanol für jeweils 2 min dehydriert.

Die Intensität der Färbung der Extrazellulärmatrix, die Zellmorphologie und die Anzahl der Zellkerne wurden lichtmikroskopisch (Leica DMI400B, Leica) analysiert und fotografisch (DFC450, Leica) dokumentiert.

## 2.12 Chromogene Immunhistochemie

### 2.12.1 Grundlagen

Durch immunhistochemische Färbeverfahren können gewebespezifische Proteine wie Transkriptionsfaktoren im Zellkern, Proteine der Extrazellulärmatrix und membranständige Proteine lokalisiert und dargestellt werden. Bei diesen Färbeverfahren sind histologische Schnittpräparate auf Antikörper-Antigenreaktionen zu untersuchen, die enzymatisch sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte Immunhistochemie, die sog. Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode, abgekürzt ABC-Methode, angewendet (s. Abb. 12). Ein spezifischer unkonjugierter Erstantikörper reagiert mit einem Antigen, des zu untersuchenden histologischen Gewebes (Abb. 12, A, B). An den Erstantikörper lagert sich ein an das Vitamin Biotin gekoppelter Zweitantikörper an (Abb. 12, C, D). Das Streptavidin ist direkt an das Enzym Peroxidase gekoppelt und bindet sich an die Biotin-Moleküle des Zweitantikörpers (Abb. 12, E, F). Anschließend wird das farblose Chromogensubstrat 3'3 Diaminobenzidin, abgekürzt DAB, durch die Peroxidase in ein farbiges Enzymprodukt umgewandelt und die Antikörper-Antigen Reaktion durch Braunfärbung des Gewebes nachgewiesen (Pezzutto et al., 2006).

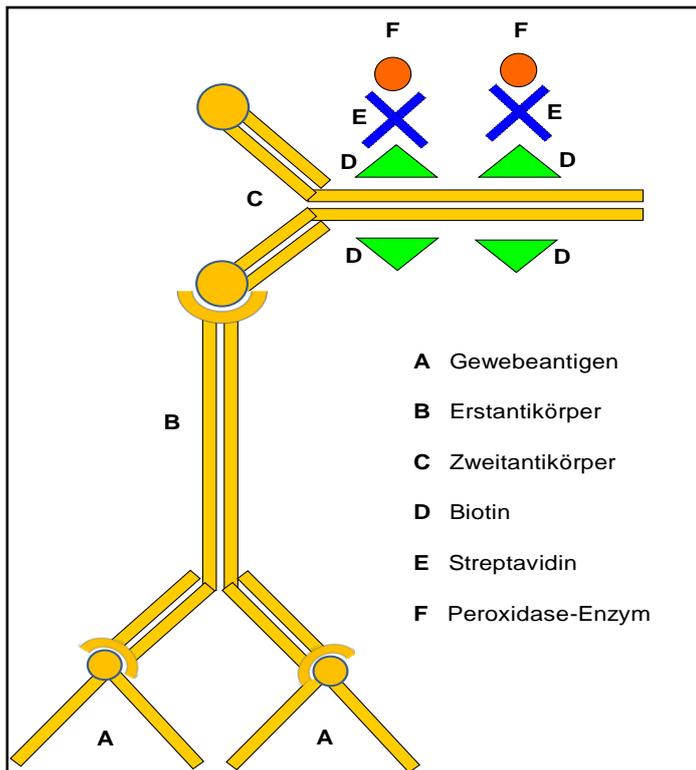


Abb. 12: Indirekte immunhistochemische Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode

Der Erstantikörper **B** reagiert mit dem Gewebeantigen **A**. Der Biotin gekoppelte Zweitantikörper **C** lagert sich an den Erstantikörper **B** an. Streptavidin **E** hängt sich direkt an das Peroxidase-Enzym **F** und verbindet sich mit dem Biotin **D** gekoppelten Zweitantikörper **C**.

### 2.12.2 Durchführung

Nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt erfolgte der Nachweis knorpelspezifischer Proteine durch chromogene Immunhistochemie (s. Tabelle 8). Als Positivkontrolle dienten Gefrierschnitte humanen Nasenseptumknorpels und als Negativkontrolle Gefrierschnitte von Hühnermuskelgewebe ohne Inkubation des Erstantikörpers.

Tabelle 8: Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Antikörper Spezies	Isotyp	Hersteller
Anti-SOX-9	Kaninchen-polyklonal, Anti-human	Ig G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Anti-Kollagen 2	Maus-monoklonal, Anti-human	Ig G	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Anti-Aggrekan	Maus-monoklonal, Anti-human	Ig G	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA

Tabelle 9: Verwendete Zweitantikörper

Antikörper	Isotyp	Hersteller
Biotin-Anti-Maus	Ig G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Biotin-Anti-Kaninchen	Ig G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Nach Entfernung des O.C.T.<sup>™</sup> Tissue-Tek<sup>®</sup> mittels 1 x PBS wurden die Gefrierschnitte anschließend durch Aceton/Methanol fixiert. Um die Flüssigkeiten gezielt auftragen zu können, wurden die Gefrierschnitte nach dem Trocknen mit einem Fettstift (PAP-Pen, Sci Sciences, München) umrandet. Für die Durchführung der chromogenen Immunhistochemie wurden die Gefrierschnitte in vierkammerige Kunststoffplatten (Quatriperm-Schale, Nalge Nunc International, New York, NY, USA) platziert. Um unspezifische Bindungsstellen, genannt Epitope, des Gewebes zu blockieren, wurde aus fötalem Kälberserum und 1 x PBS eine 10%-ige Blockierlösung hergestellt. Die umrandeten Gefrierschnitte wurden bei RT für 30 min vollständig damit bedeckt. Durch die Zugabe von 0,3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu der Blockierlösung wurden die endogenen Peroxidasen des Gewebes gehemmt. Für die nachfolgenden Waschschrte und die Verdünnung der Antikörper wurde 1 x PBS mit 0,05%-igem Triton X-100 zu PBST vermischt. Nach einem Waschschrte mit PBST erfolgte für 20 h die Inkubation der Gefrierschnitte mit den Erstantikörpern bei 4°C. Die Objektträger wurden mit je 100 µl der mit PBST verdünnten Erstantikörper (Mischverhältnis 1:100) beträufelt. Nach 20-stündiger Inkubation in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger dreimal hintereinander mit 1 x PBS gespült. Bei RT erfolgte für 30 min die Inkubation der Gefrierschnitte mit 100 µl des mit PBST verdünnten biotinylierten Zweitantikörpers (Mischverhältnis 1:500). Nach einem erneuten Waschschrte mit PBST erfolgte die Beschichtung der Gefrierschnitte mit 100 µl Streptavidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Nach 1 h wurden die Gefrierschnitte letztmalig mit PBST gespült und unter Lichtabschluss mit dem DAB-Chromogen (3'3 Diaminobenzidine (DAB) enhanced liquid system, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bedeckt. Das DAB-Chromogen und der DAB-Liquid Puffer wurden gemäß Herstellerangaben vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde die chromogene Färbereaktion durch einen Waschschrte mit destilliertem Wasser gestoppt.

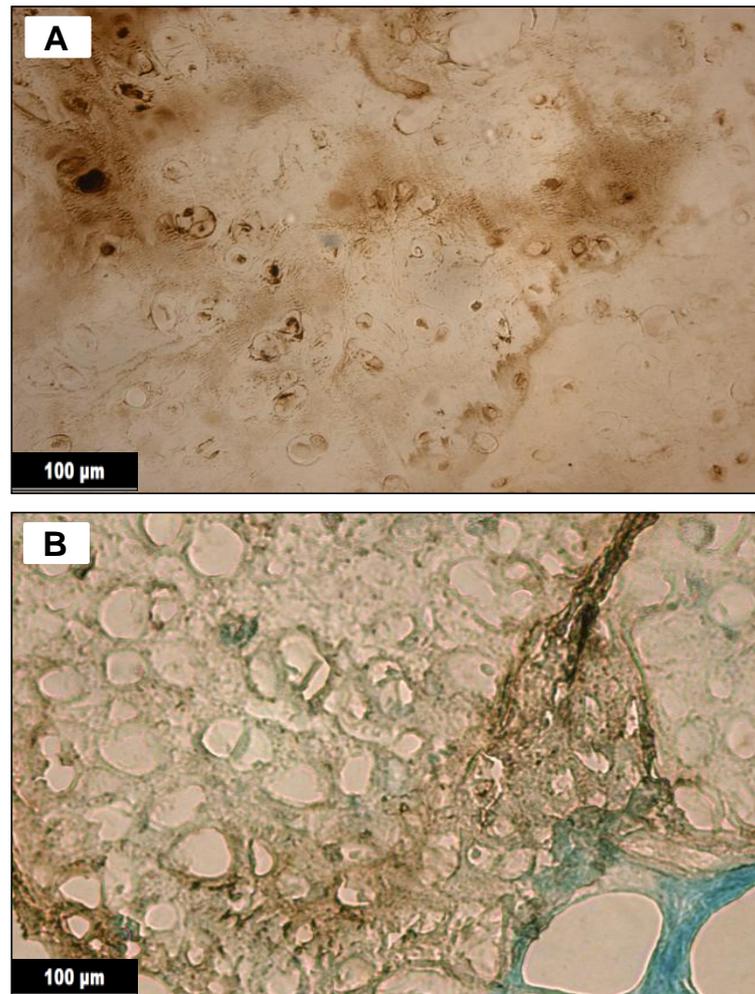


Abb. 13: Chromogene Immunhistochemie, humaner Nasenseptumknorpel  
Bild **A**: Nachweis von SOX-9 in den Zellkernen der Knorpelzellen  
Bild **B**: Nachweis von Kollagen 2 in der extrazellulären Matrix der Knorpelzellen  
Vergleichsmaßstab: 100 µm

Nur bei Antikörpern, die auf knorpelspezifische Proteine der Extrazellulärmatrix reagieren wie Anti-Kollagen 2 und Anti-Aggrekan, erfolgte eine zusätzliche Färbung der Zellkerne durch Nuclear-Fast-Green (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (s. Abb. 13, B). Die Objektträger wurden für 1 min in eine mit Nuclear-Fast-Green gefüllte Küvette getaucht, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und in Ethanol aufsteigender Konzentration von 70% bis 100% dehydriert. Nach dem Trocknen der gefärbten Gefrierschnitte unter dem Abzug konnten sie mit Entellan beträufelt und durch ein schützendes Deckglas haltbar gemacht werden. Die Braunfärbung der Extrazellulärmatrix und der Nachweis des Transkriptionsfaktors SOX-9 in den Zellkernen wurden lichtmikroskopisch (Leica DMI400B, Leica) analysiert und fotografisch (DFC450, Leica) dokumentiert (s. Abb. 13).

## 2.13 *In vivo*-Kaninchenmodell

### 2.13.1 Versuchstiere

Die mittelgroßen Kaninchen der Rasse Neuseeländer Weiße mit der englischen Bezeichnung New Zealand white rabbit zeichnen sich durch lange, gerade und kaum behaarte Ohren aus. Die Regierung von Unterfranken bewilligte den Antrag auf Genehmigung des Tierversuchsvorhabens mit der Kaninchenrasse Neuseeländer Weiße (AZ:55.2-2531.01-67/09). Für das *in vivo*-Kaninchenmodell wurden 6 weibliche Kaninchen von der Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld) bezogen. Die Tierhaltung erfolgte artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes im Großtierhaus des Universitätsklinikums Würzburg. Bis zu zwei Kaninchen waren pro Kunststoffkäfig in einem fensterlosen, klimatisierten Raum bei RT und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% untergebracht. Durch eine automatisierte Lichtanlage konnte ein Tag-Nacht-Rhythmus simuliert werden. Dreimal am Tag wurden die Kaninchen mit frischem Wasser und Futter ad libitum versorgt. Für die Durchführung der chirurgischen Eingriffe wurden die Kaninchen einzeln in Kunststofftransportboxen in einem klimatisierten PKW zwei Stunden vor dem Eingriff in den Tieroperationssaal der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen) transportiert. Nach einer postoperativen Ruhe- und Überwachungszeit wurden die Kaninchen wieder in das Großtierhaus zurück gebracht.

## 2.13.2 Versuchsaufbau

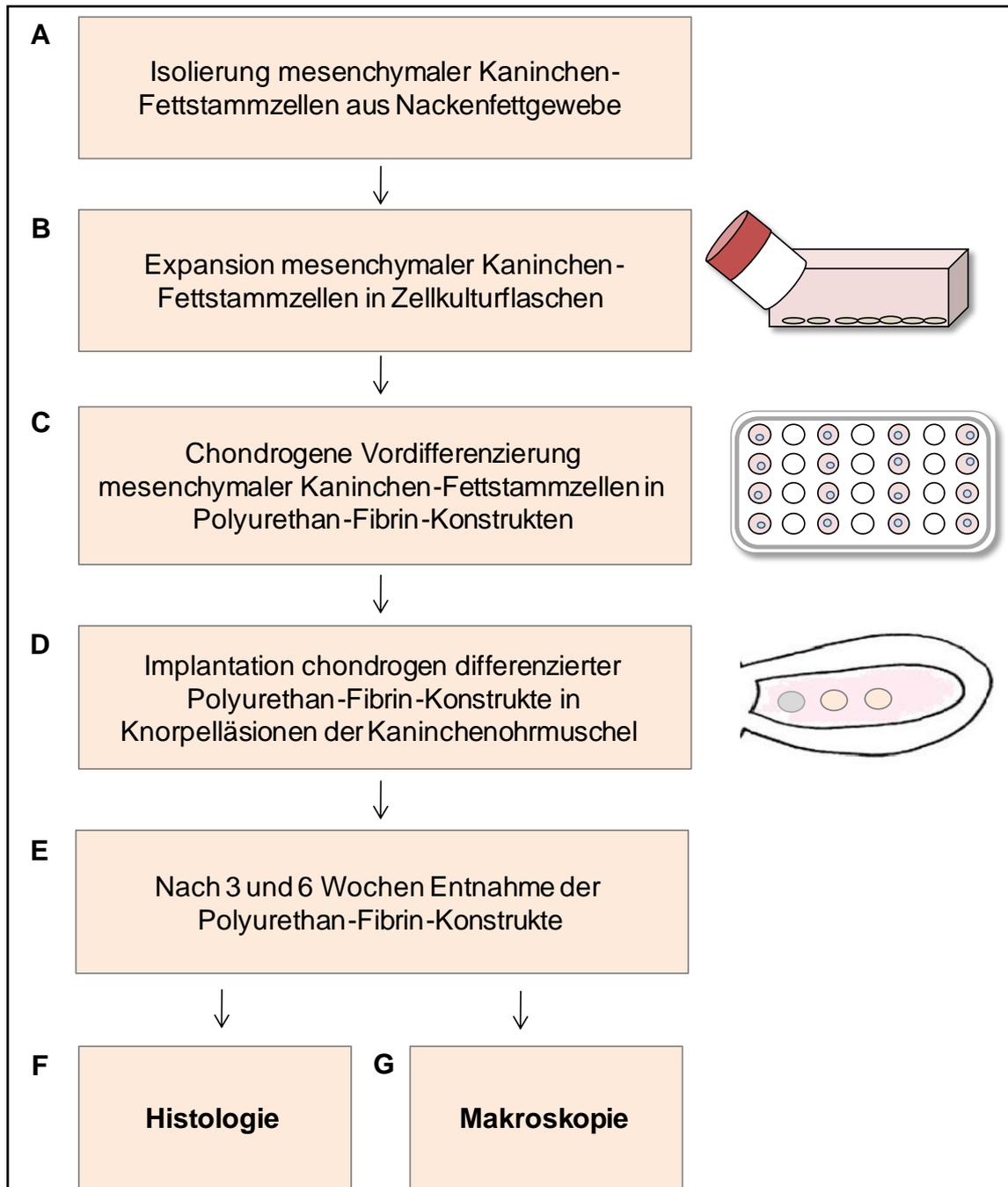


Abb. 14: Schematische Darstellung des *in vivo*-Kaninchenmodells. Mesenchymale Fettstammzellen wurden aus Kaninchen-Nackenfettgewebe isoliert. Nach einer 14-tägigen Expansion in Zellkulturflaschen wurden die mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukte eingebracht und chondrogen differenziert. Diese Konstrukte wurden in Knorpelläsionen der Kaninchenohrmuschel implantiert und zuerst nach 3, dann nach weiteren 3 Wochen zur makroskopischen und histologischen Untersuchung entnommen.

In Anlehnung an das von ten Koppel und Mitarbeitern entwickelte *in vivo*-"rabbit pinna punch-hole"-Modell (ten Koppel et al., 2001) erfolgte im vorliegenden Tiermodell die Untersuchung chondrogen differenzierter autologer, mesenchy-

maler Kaninchen-Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten. Mit dem Ziel, autologe Rekonstruktionsmaterialien für den Kehlkopf zu generieren, wurden die *in vitro* chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte *in vivo* auf ihre Integrität und Stabilität untersucht. Aus Nackenfettgewebe der Kaninchen (n = 6) wurden mesenchymale Fettstammzellen isoliert (Abb. 14, A), die anschließend *in vitro* in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bis Passage 2 kultiviert wurden (Abb. 14, B). In zylinderförmigen Polyurethan-Fibrin-Konstrukten erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen (Abb. 14, C). Die großen Ohrmuscheln der Kaninchen wurden dazu genutzt, 4 mm große Knorpelläsionen heraus zu stanzen. In diese wurden die chondrogen vordifferenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte des jeweiligen Fett-Spenderkaninchens implantiert (Abb. 14, D). Die implantierten Konstrukte wurden nach 3 und 6 Wochen chirurgisch entnommen (Abb. 14, E) und makroskopisch sowie histologisch untersucht (Abb. 14, F, G).

## 2.14 *In vivo*-Operationsverfahren

Die nachfolgend beschriebenen chirurgischen Eingriffe an den Kaninchen sowie die Anästhesie wurden von der Oberärztin Dr. med. Katrin Frölich an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen) vorgenommen, assistiert von der Verfasserin dieser Arbeit.

### 2.14.1 Anästhesie und Behandlungsvorbereitung

Vor jedem chirurgischen Eingriff wurden die Kaninchen klinisch untersucht und gewogen. Nackenfettentnahme, Implantation und Entnahme der Konstrukte erfolgten in Narkose: für die Anfangsdosis des Narkotikums wurden 5 mg/kg Körpergewicht des Muskelrelaxans Xylazin (2% Rompun®) und 35 mg/kg Körpergewicht des Anästhetikums Ketamin intramuskulär appliziert. Durch das Setzen eines adäquaten Schmerzreizes an den Vorderläufen des Kaninchens und durch die Kontrolle des Ohrreflexes im äußeren Gehörgang konnte die ausreichende Narkosetiefe überprüft werden. Nach der Betäubung der Kaninchen wurde die Zunge aus dem Maul der Tiere heraus verlegt. Um ein Austrocknen

der Augen zu verhindern, wurde Augensalbe appliziert und die Augen mit einer Mullbinde abgedeckt.

### **2.14.2 Nackenfettentnahme**

Die Kaninchen besitzen zwischen ihren Schulterblättern ein Nackenfettpolster. Das Fettpolster wurde ertastet und das darüber liegende weiße Fell mit einem Rasiergerät entfernt. Nach Rasur und Desinfektion des Operations-Gebiets mit 70%-igem Ethanol verschaffte sich die Operateurin mit einem Hautschnitt Zugang zu dem Fettgewebe. Mit Skalpell und stumpfer Schere wurde das Fettgewebe von den umgebenden Faszien frei präpariert und als zusammenhängendes Fettpolster in ein steriles Gefäß mit 1 x PBS und 1% Penicillin/Streptomycin überführt. Auftretende Blutungen wurden mit der Koagulationspinzette kauterisiert. Der Wundverschluss erfolgte durch Einzelknopfnähte.

### **2.14.3 Isolierung mesenchymaler Kaninchen-Fettstammzellen aus Nackenfett**

Aus dem operativ gewonnen Nackenfettgewebe der Kaninchen konnten bei gleicher Vorgehensweise wie bei humanem abdominalen Fettgewebe mesenchymale Stammzellen isoliert werden. Das Kaninchen-Fettgewebe wurde unter sterilen Bedingungen zerkleinert, 3 Stunden durch Zugabe von Collagenase P verdaut und das gewonnene Zellkugelchen in mit Kaninchenserum (Rabbit Serum PAA, Labora the cell culture company GmbH, Pasching, Österreich) angereicherten Zellkulturmedium resuspendiert und in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Das mit Kaninchenserum angereicherte Zellkulturmedium der frisch isolierten mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen der Passage 0 wurde bis zum Erreichen der Passage 2 jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellkultur der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen unterschied sich nicht von der bereits beschriebenen Zellkultur humaner mesenchymaler Fettstammzellen (2.3).

### **2.14.4 Chondrogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten**

Pro Versuchsreihe wurden drei Polyurethan-Fibrin-Konstrukte mit jeweils 1 x 10<sup>6</sup> mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen der Passage 3 besiedelt.

Die Herstellung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte erfolgte wie bereits in 2.6.4 beschrieben. Durch die Zugabe von 700  $\mu$ l Differenzierungsmediums wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte während 14 Tagen in einer 48-Well-Platte *in vitro* chondrogen vordifferenziert. Das chondrogene Differenzierungsmedium bestand aus den gleichen Komponenten wie bereits in Tabelle 4 dargestellt. Zu diesem zweimal in der Woche frisch angesetzten Differenzierungsmedium wurden folgende Wachstumsfaktorkombinationen (s. Tabelle 10) beigemischt.

Tabelle 10: Verwendete Wachstumsfaktorkombination

Kombinationen der Wachstumsfaktoren		Endkonzentration
7 Tage	BMP-6	500 ng/ml
weitere 7 Tage	BMP-6	500 ng/ml
	TGF- $\beta$ 3	50 ng /ml

Nach 14 Tagen wurden zwei der drei Polyurethan-Fibrin-Konstrukte für die Implantation in die Knorpelläsionen der Kaninchen-Ohrmuscheln vorbereitet und das dritte Konstrukt in 4%-igem Paraformaldehyd für die Anfertigung präoperativer Gefrierschnitte fixiert.

### 2.14.5 Defektsetzung und Einbringen der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte

Die behaarten Hautareale der konkaven Kaninchenohrmuschel wurden rasiert und mit 70%-igem Ethanol desinfiziert (Abb. 15, A). Die Ohren der Kaninchen eigneten sich, um jeweils drei bis fünf Knorpelläsionen in eine Reihe zu setzen, in welche die chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte implantiert wurden. Die hier angewandte Operationsmethode beruht auf dem von ten Koppel und seinen Mitarbeitern entwickelten "rabbit pinna punch-hole"-Modell (ten Koppel et al., 2001).



**A**  
Intakte Innenseite einer  
Kaninchenohrmuschel.



**B**  
Darstellung des  
Kaninchenohrknorpels mit einem  
Präparationmesser nach Plester.



**C**  
Setzen von Knorpelläsionen mit einer  
Biopsiestanze  $\varnothing$  4mm.



**D**  
Knorpelläsionen in der  
Kaninchenohrmuschel.



**E**  
Implantation der chondrogen  
vordifferenzierten Polyurethan-Fibrin-  
Konstrukte in die Knorpelläsionen.  
Anschließend Wundverschluss  
durch Einzelknopfnähte.

Abb. 15: Fotografische Darstellung der Implantation der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in die Kaninchenohrmuschel

Nach dem Abdecken des Kaninchens und der Desinfektion des Operations-Gebiets erfolgte ein zentraler Hautschnitt an der konkaven Seite der Kaninchenohrmuschel. Mit einem Präparationsmesser nach Plester wurden die dünne Hautschicht und das Perichondrium vorsichtig von dem darunterliegenden Ohrknorpel abgelöst. Durch das Anheben der Hautschicht konnte der Ohrknorpel dargestellt werden (Abb. 15, B). Unter Schonung der Haut und des Perichondriums auf der Ohrrückseite wurden mit einer Biopsiestanze kleine Knorpelplättchen mit einem Durchmesser von 4 mm ausgestanzt (Abb. 15, C, D). Durch die intakte Haut- und Perichondrium-Schicht auf der Kaninchenohrrückseite wurde eine Dislokation der implantierten Konstrukte vermieden. In die geschaffenen Knorpelläsionen wurden anschließend die einzelnen Konstrukte eingebracht (Abb. 15, E). Um weiterhin mögliche Dislokationen zu vermeiden, wurden die Konstrukte mit einer Matratzennaht fixiert und die Haut über den Knorpelläsionen vernäht. Die Wunde wurde erneut desinfiziert und mit einem Verband abgedeckt.

#### **2.14.6 Entnahme der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte**

Nach 3 bzw. 6 Wochen erfolgte die operative Entnahme der implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte. Den betäubten Kaninchen wurde in den Gehörgang eine sterile Mullkomresse gelegt, um das Eintreten von Blut oder Desinfektionsmittel in das Kaninchenohr zu vermeiden. Nach Desinfektion des Operations-Gebiets wurden die implantierten Konstrukte auf der Ohrmuschelvorderseite entlang des Narbenstranges ertastet. Die tastbaren Konstrukte wurden samt Hautbedeckung der Vorder- und Rückseite aus der Ohrmuschel geschnitten und in 1 x PBS gelagert. Auftretende Blutungen wurden mittels bipolarer Koagulationspinzette gestillt. Nach erneuter Desinfektion wurden die Wunden an der Entnahmestelle durch eine zweischichtige Vicrylnaht verschlossen und mit einem Verband abgedeckt.

### **2.15 Histologische Aufarbeitung der Kaninchenohr-Biopsien**

#### **2.15.1 Herstellung histologischer Präparate**

Nach der Entnahme der im Kaninchenohrknorpel implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden diese in ein mit 1 x PBS gefülltes Falconröhrchen

überführt. Das 1 x PBS wurde mehrmals erneuert. Für 12 h erfolgte in 4%-igem Paraformaldehyd die Fixierung der Konstrukte. Zwecks makroskopischer Untersuchungen wurden Vorder- und Rückseite des fixierten Ohrknorpels fotografisch dokumentiert. Anschließend wurde der Ohrknorpel mit einem Skalpell in kleinere Segmente zerteilt. Diese Knorpelsegmente samt implantiertem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt wurden in quadratische Tissue Tek® Cryomolds® gelegt und mit 30%-iger Glukose beschichtet. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Hälfte der Glukose abgesaugt und durch Tissue-Tek® O.C.T.™ ersetzt. Nach zwei Tagen erfolgte das Einbetten der Knorpelsegmente in reines Tissue-Tek® O.C.T.™. Nach zwei weiteren Tagen wurden die in Tissue-Tek® O.C.T.™ eingebetteten Knorpelsegmente bei -20°C eingefroren. Mit der Gefrierschneidemaschine Leica CM 1510 S wurden bei -25°C 12 µm Gefrierschnitte angefertigt. Auf jedem Objektträger konnten 6 Gefrierschnitte platziert und für weitere histologische Untersuchungen, wie unter 2.10 beschrieben, vorbereitet werden.

### **2.15.2 Histologische Färbungen**

Die Gefrierschnitte der nach 3 bzw. 6 Wochen entnommenen Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden durch histologische Färbungen auf ihre Integration in den Kaninchenohrknorpel, auf Entzündungsreaktionen und auf mögliche Resorption der Trägermatrix untersucht. Knorpelspezifische Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie saure Glykosaminoglykane, wurden durch Alzianblau- und Safranin O-Färbung dargestellt. Die Vorgehensweise bei den Färbungen der Gefrierschnitt erfolgte wie bereits unter 2.11 beschrieben.

## **2.16 Ergebnisauswertung**

### **2.16.1 Ergebnisanalyse der Durchflusszytometrie**

Für die Bestimmung stammzellspezifischer Oberflächenmarker wurde das Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences) verwendet. Die Datenauswertung und Darstellung der Ergebnisse in Histogrammen erfolgte mit der Software FACSDiva™ (BD Biosciences).

### 2.16.2 Analyse der relativen Genexpression

Als Maß für die Quantifizierung der DNA Startmenge wurden die sog. CT-Werte herangezogen. Der gemessene CT-Wert (Cycle Treshold, TaqMan™) entspricht der Zyklenzahl der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion in der das Fluoreszenzsignal der Probe die Hintergrundfluoreszenz übertrifft. Es wurden neben den Zielgensequenzen, Kollagen 1, Kollagen 2, Kollagen 9, Kollagen 10, Aggrekan und SOX-9 auch ein Haushaltsgen GAPDH als Referenzgen mit amplifiziert. Für die Normalisierung des DNA-Gehalts wurde die Differenz aus der Menge an Ziel-DNA (CT (Zielgen)) und der Menge des Referenzgens (CT (Referenzgen)) bestimmt.

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{Referenzgen})$$

Nach dieser Normierung wurde von den  $\Delta CT$ -Werten der entwickelten Knorpelersatzmaterialien ( $\Delta CT$  (Knorpelersatz)) der  $\Delta CT$ -Wert der Positivkontrolle hyaliner Nasenseptumknorpel ( $\Delta CT$  (Knorpel)) subtrahiert.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Knorpelersatz}) - \Delta CT (\text{Knorpel})$$

Unter der Annahme, dass sich die DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt, wurde die anschließende Analyse der relativen Genexpression mit der auf der Wachstumsgleichung  $X_n = X_0 + (1 + p)^n$  (mit  $X_0$  als Startpunkt,  $p$  als Wachstumsrate und  $X_n$  als Wert nach dem  $n$ -ten Zyklus) beruhenden  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode durchgeführt (Livak et al., 2001).

### 2.16.3 Auswertung der Ergebnisse der biochemischen Analyse

Aus den Mittelwerten der Absorptionen wurde bei jeder Standardreihe eine Eichgerade erstellt. In deren Geraden-Gleichung wurden die Mittelwerte der Absorptionen der einzelnen Proben eingesetzt, um den Kollagen- und Glykosamionglykan-Gehalt pro  $\mu\text{l}$  Gewebeextrakt zu ermitteln. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Kollagen- und Glykosaminoglykan-Gehaltes bezogen auf den photometrisch bestimmten genomischen DNA-Gehalt in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 2.16.4 Statistische Auswertung der Daten und ihre Darstellung

Mittels statistischer Verfahren wurden die Messwerte der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion und der biochemischen Analyse auf signifikante Unterschiede analysiert. Dazu eigneten sich Signifikanztests, im vorliegenden Fall Post-hoc-Tests, aus der Statistik. Diese vergleichen Mittelwerte auf signifikante Unterschiede.

Zur Datenanalyse wurde analog zu der Publikation (Froelich et al., 2012, n = 3) das Statistikprogramm GraphPadPRISM® Version 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) mit der einfaktoriellen Varianzanalyse, abgekürzt ANOVA, nach dem Bonferroni-Verfahren eingesetzt. Dieses gilt als konservativ und sagt bei Anzeige eines signifikanten Unterschieds zwischen zwei Gruppen, im vorliegenden Fall unterschiedliche chondrogene Differenzierungsmedien, aus, dass dieser Unterschied mit hoher Sicherheit tatsächlich existiert (Rasch et al., 2006). Die Nullhypothese  $H_0$  beruht auf der Annahme, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Mittelwerten besteht. Für die Alternativhypothese  $H_1$ , die Mittelwerte sind unterschiedlich, entscheidet man sich, wenn der im Testverfahren berechnete p-Wert unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 liegt. Ausschlaggebend ist die Überlegung, dass Mittelwerte, deren 95%-Konfidenzintervalle nicht überlappen, als unterschiedlich auf dem Signifikanzniveau von 0,05 zu betrachten sind.

Die graphische Darstellung der Mittelwerte erfolgte mittels Balkendiagrammen, die auch den Standardfehler des Mittelwertes enthalten (s. Abb. 16). Die Darstellung der nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ermittelten Messwerte der Genexpression in Balkendiagrammen erfordert für die y-Achse eine Skalierung im logarithmischen Maßstab zur Basis 2 (Abb. 16, A). Dadurch kann der Startwert nicht der Wert 0 sein, sondern wird messwertspezifisch festgelegt. Die Standardfehler erscheinen in diesen Diagrammen verkürzt gegenüber einer linearen Skalierung (Abb. 16., A, B).

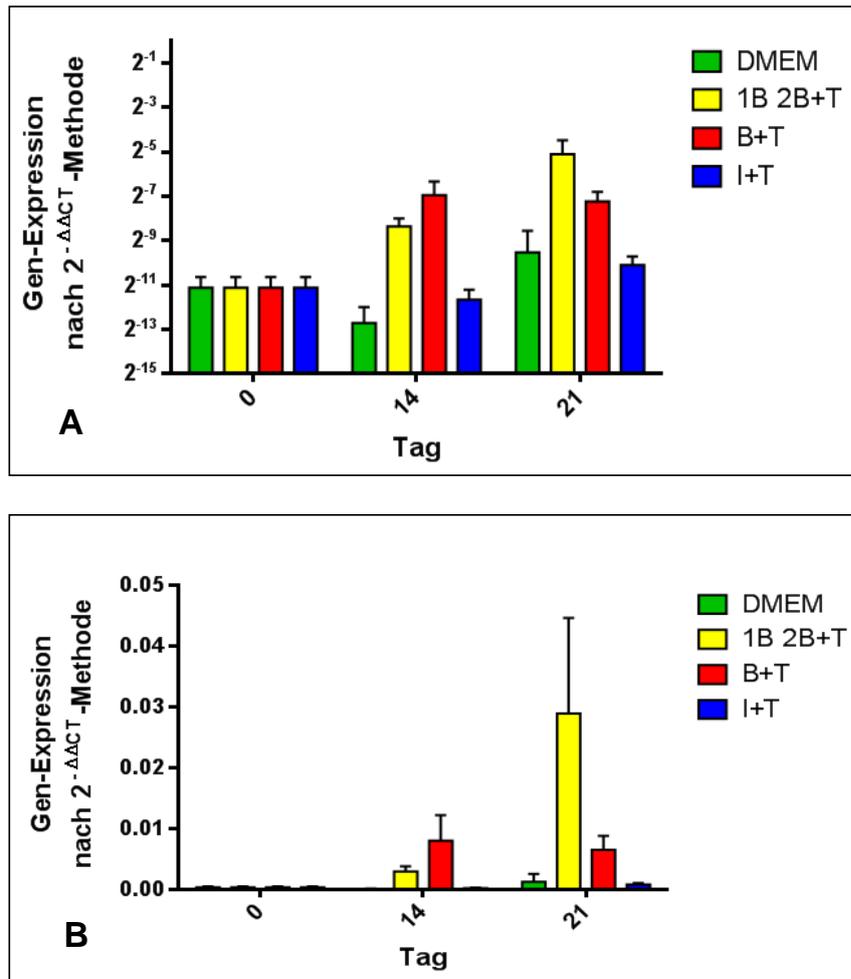


Abb. 16: Darstellung der Genexpression nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode im Balkendiagramm  
 Bild **A**: Skalierung der y-Achse im logarithmischen Maßstab zur Basis 2  
 Bild **B**: Skalierung der y-Achse im linearen Maßstab

### 3 ERGEBNISSE

In dem folgenden Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse der molekularbiologischen, biochemischen und histologischen Analyse des *in vitro* gezüchteten Knorpelersatzgewebes aus mesenchymalen Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt betrachtet. Die Beschreibung der makroskopischen und histologischen Untersuchung der *in vivo* im Kaninchenmodell implantierten chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte schließt sich an.

#### 3.1 Zellkultur

Die aus Fettgewebe isolierten mesenchymalen Stammzellen besaßen die Fähigkeit, 6 Stunden nach Aussaat sich am Plastikboden von Monolayer-Zellkulturflaschen anzuheften (Abb. 17, A). Lichtmikroskopisch konnte man innerhalb 24 Stunden die Entwicklung der erst rundlichen mesenchymalen Fettstammzellen zu spindelförmigen, fibroblastenähnlichen Zellen verfolgen (Abb. 17, B). Nach 7 Tagen Monolayer-Kultur war bei einer Konfluenz von 80% der gesamte Boden der Zellkulturflasche mit adhärennten mesenchymalen Fettstammzellen bedeckt und die mesenchymalen Fettstammzellen wurden auf 2 bis 3 neue Zellkulturflaschen aufgeteilt (Abb. 17, C). Bei einer Vitalität von durchschnittlich 75% konnte man aus einer Zellkulturflasche  $2 \times 10^6$  mesenchymale Fettstammzellen ernten.

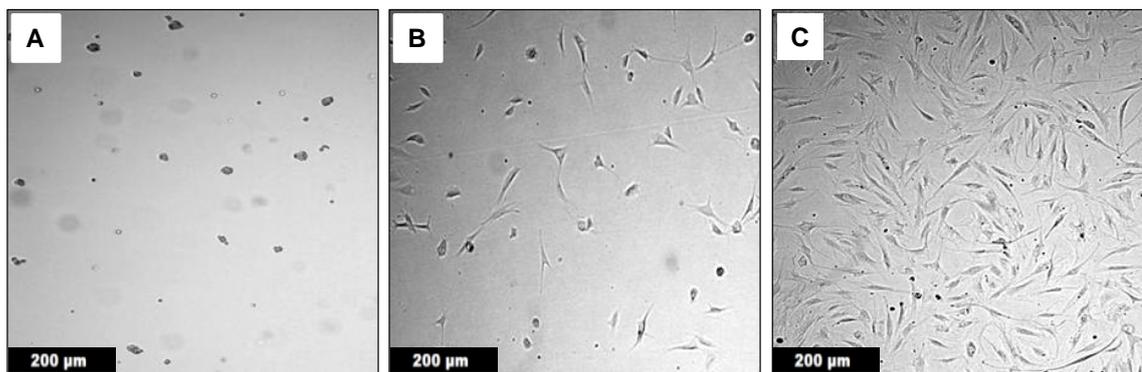


Abb. 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen mesenchymaler Fettstammzellen in Monolayer-Kultur

Bild **A**: 6 Stunden nach Aussaat der isolierten mesenchymalen Fettstammzellen

Bild **B**: 24 Stunden nach Aussaat der isolierten mesenchymalen Fettstammzellen

Bild **C**: 7 Tage nach Aussaat der isolierten mesenchymalen Fettstammzellen

Vergleichsmaßstab: 200 µm

### 3.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden die verwendeten mesenchymalen Fettstammzellen auf die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle untersucht. Eine für mesenchymale Stammzellen typische positive Reaktion auf die Oberflächenantigene CD44, CD73, CD90, CD105 konnte bei den untersuchten mesenchymalen Fettstammzellen festgestellt werden (s. Abb. 18). Dagegen zeigten die mesenchymalen Fettstammzellen keine Expression der hämatopoetischen Oberflächenantigene CD31, CD34 und CD45 (s. Abb. 19).

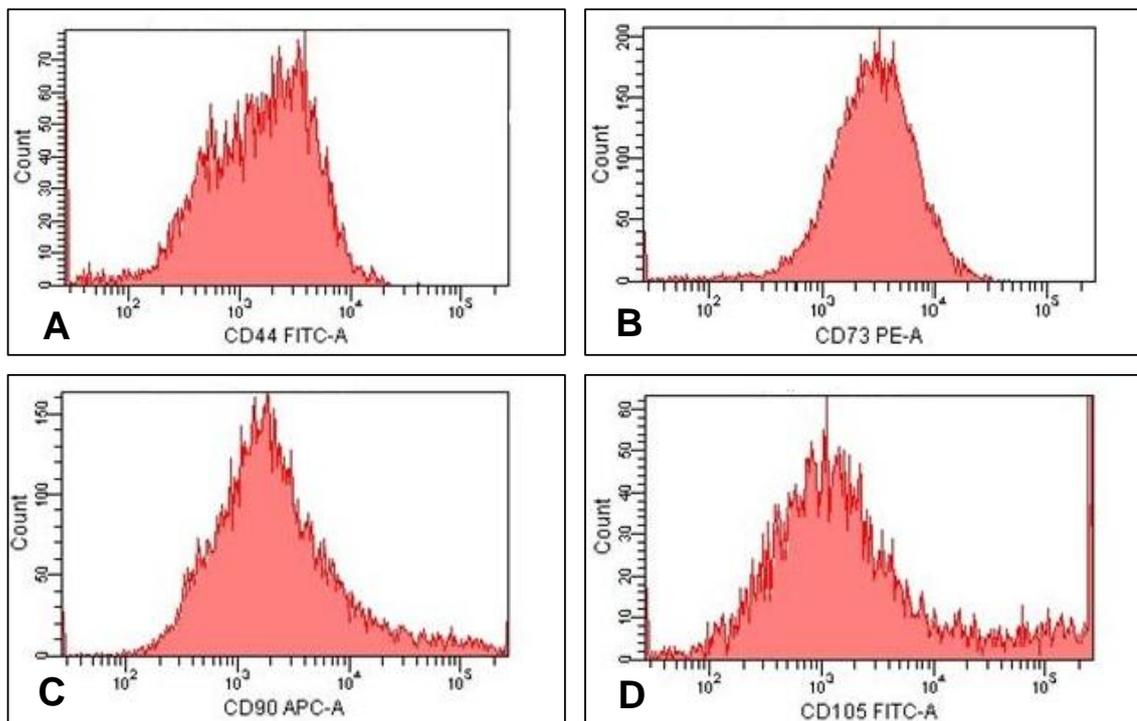


Abb. 18: Darstellung der Expression stammzellspezifischer Oberflächenmoleküle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten mesenchymalen Fettstammzellen mittels Durchflusszytometrie. Auf der x-Achse ist das Fluoreszenzsignal, auf der y-Achse die Anzahl der Ereignisse dargestellt.

Bild **A**: Positiver Nachweis des FITC-konjugierten CD44

Bild **B**: Positiver Nachweis des PE-konjugierten CD73

Bild **C**: Positiver Nachweis des APC-konjugierten CD90

Bild **D**: Positiver Nachweis des FITC-konjugierten CD105

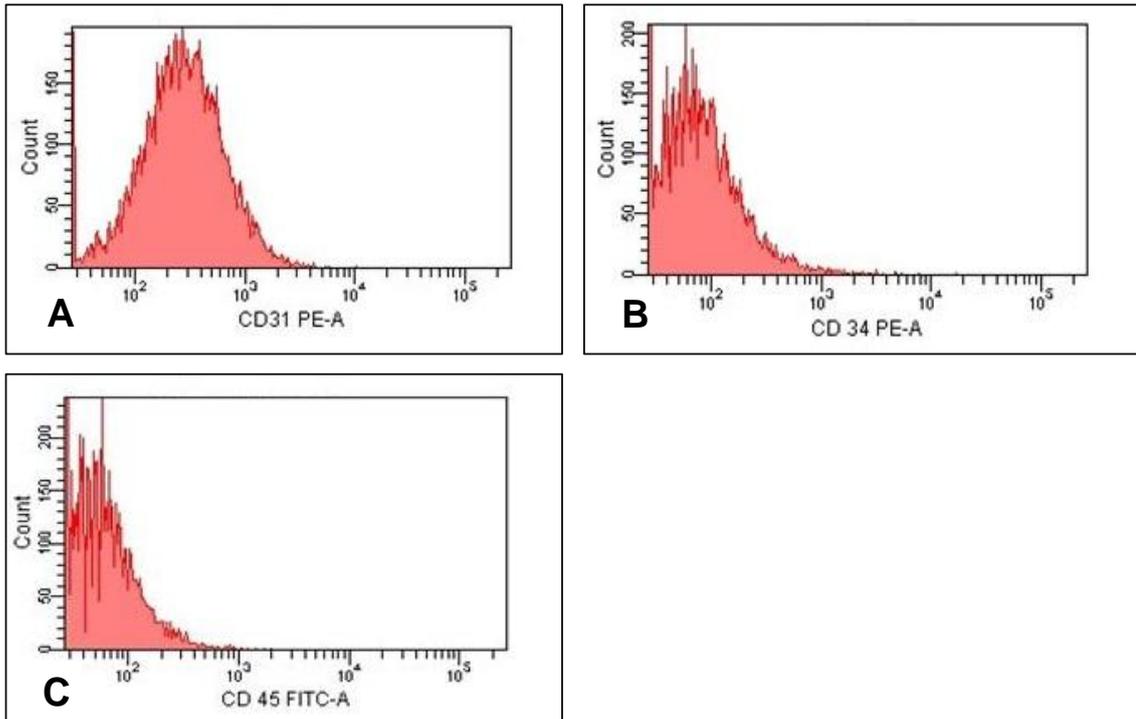


Abb. 19: Darstellung der Expression hämatopoetischer Oberflächenmoleküle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten mesenchymalen Fettstammzellen mittels Durchflusszytometrie. Auf der x-Achse ist das Fluoreszenzsignal, auf der y-Achse die Anzahl der Ereignisse dargestellt.

Bild A: Negativer Nachweis des PE-konjugierten CD31

Bild B: Negativer Nachweis des PE-konjugierten CD34

Bild C: Negativer Nachweis des FITC-konjugierten CD45

### 3.3 Multidifferenzierungspotential mesenchymaler Fettstammzellen

Um zu sichern, dass es sich bei den verwendeten mesenchymalen Fettstammzellen um Zellen mit Differenzierungspotential handelt, wurden zusätzlich zu der Durchflusszytometrie die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung anhand histologischer Färbungen untersucht.

#### 3.3.1 Adipogene Differenzierung

Nach 14-tägiger Inkubation der mesenchymalen Fettstammzellen mit adipogenem Differenzierungsmedium waren lichtmikroskopisch helle, tropfenförmige intrazelluläre Lipidvakuolen zu erkennen (Abb. 20, A). Diese für die adipogene Differenzierung typischen intrazellulären Lipidvakuolen wurden mit Oil Red O rötlich und die Zellkerne mit Mayers-Hematoxylin blau gefärbt. Während 14 Tagen im Expansionsmedium kultivierte Zellen bildeten keine Lipidvakuolen und zeigten nur eine positive blaue Zellkernfärbung (Abb. 20, B).

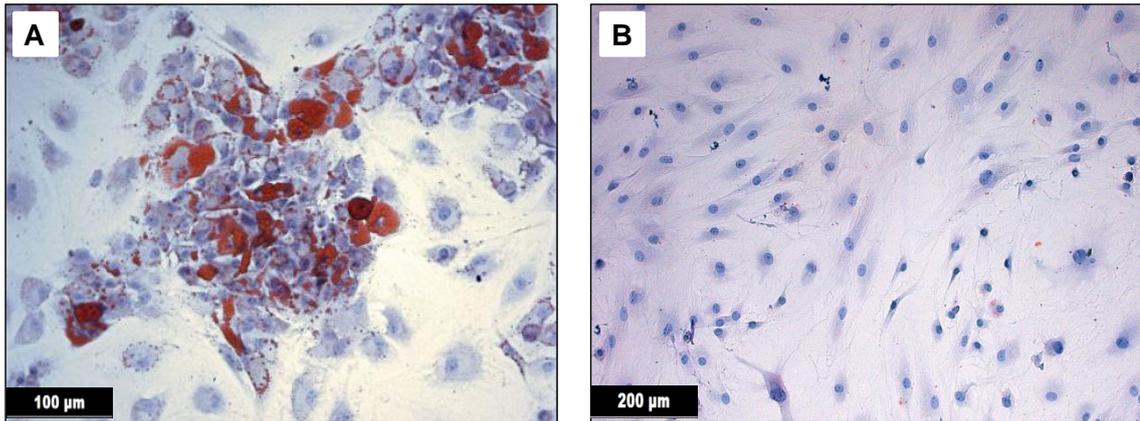


Abb. 20: Histologischer Nachweis der adipogenen Differenzierung durch Oil Red O-Färbung

Bild **A**: Rot gefärbte Lipidvakuolen nach 14 Tagen adipogener Differenzierung  
Vergleichsmaßstab: 100 µm

Bild **B**: Keine Lipidvakuolen nachzuweisen bei 14-tägiger Kultivierung der mesenchymalen Fettstammzellen im Expansionsmedium, Vergleichsmaßstab: 200 µm

### 3.3.2 Osteogene Differenzierung

Nach 28-tägiger Inkubation der mesenchymalen Fettstammzellen mit osteogenem Differenzierungsmedium waren lichtmikroskopisch in der Extrazellulärmatrrix der Zellen Kalziumablagerungen zu erkennen. Durch histologische Färbungen ließen sich Zellanordnung und Kalziumsynthese in der Extrazellulärmatrrix darstellen. Anhand der von Kossa-Färbung wurden die Kalziumablagerungen dunkelbraun bis schwarz und die Zellkerne durch Kernechtrot rosa gefärbt (Abb. 21, A).

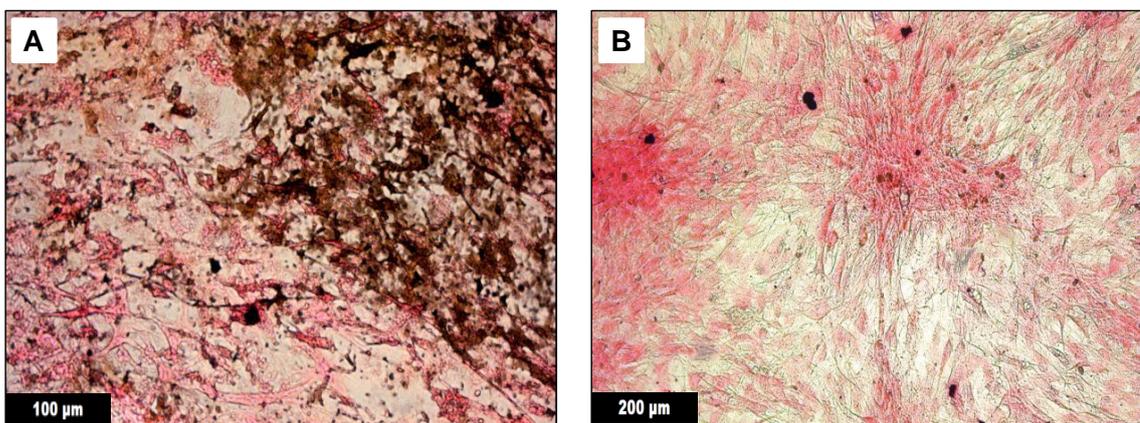


Abb. 21: Histologischer Nachweis der osteogenen Differenzierung durch von Kossa-Färbung

Bild **A**: Schwarz-braun gefärbte Kalziumablagerungen nach 28-tägiger osteogener Differenzierung, Vergleichsmaßstab: 100 µm

Bild **B**: Keine nachweisbaren Kalziumablagerungen bei 14-tägiger Kultivierung der mesenchymalen Fettstammzellen im Expansionsmedium, Vergleichsmaßstab: 200 µm

Die Kalziumsynthese der differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen konnte durch eine Alizarinrot-Färbung bestätigt werden (Abb. 22, A). In der Extrazellulärmatrix von mesenchymalen Fettstammzellen, die 14 Tage im Expansionsmedium kultiviert wurden, konnten sowohl durch die von Kossa-Färbung als auch durch die Alizarinrot-Färbung histologisch keine Kalziumablagerungen nachgewiesen werden (s. Abb. 21, Abb. 22, B).

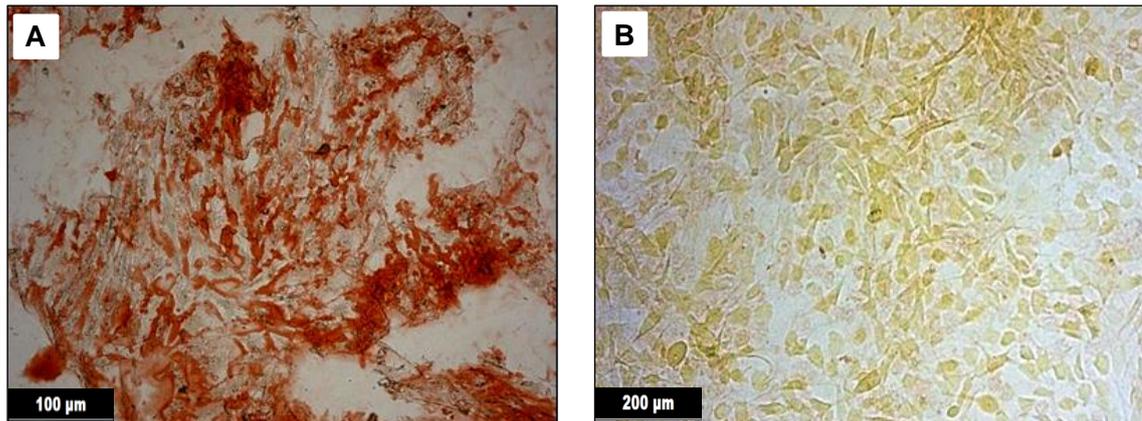


Abb. 22: Histologischer Nachweis der osteogenen Differenzierung durch Alizarinrot-Färbung

Bild **A**: Rot gefärbte Kalziumablagerungen nach 28-tägiger osteogener Differenzierung  
Vergleichsmaßstab: 100 µm

Bild **B**: Keine nachweisbaren Kalziumablagerungen bei 14-tägiger Kultivierung der mesenchymalen Fettstammzellen im Expansionsmedium, Vergleichsmaßstab: 200 µm

### 3.3.3 Chondrogene Differenzierung

Mesenchymale Fettstammzellen wurden als dreidimensionales, hochdichtes Zellkugelchen 14 Tage in chondrogenem Medium mit der Wachstumsfaktorkombination TGF- $\beta$ 3 50 ng/ml und BMP-6 500 ng/ml kultiviert. Die von den Zellkugelchen angefertigten Gefrierschnitte wurden mit Alzianblau gefärbt. Im Gegensatz zu den Zellkugelchen, die 14 Tage im Expansionsmedium kultiviert wurden, konnte bei den chondrogen differenzierten Zellkugelchen eine Größenzunahme beobachtet werden. Durch die Alzianblau-Färbung wurden in der Extrazellulärmatrix der chondrogen differenzierten Zellkugelchen saure Glykosaminoglykane nachgewiesen (s. Abb. 23, A). Bei den im Expansionsmedium kultivierten Zellkugelchen war keine Blaufärbung der Extrazellulärmatrix feststellbar (s. Abb. 23, B).

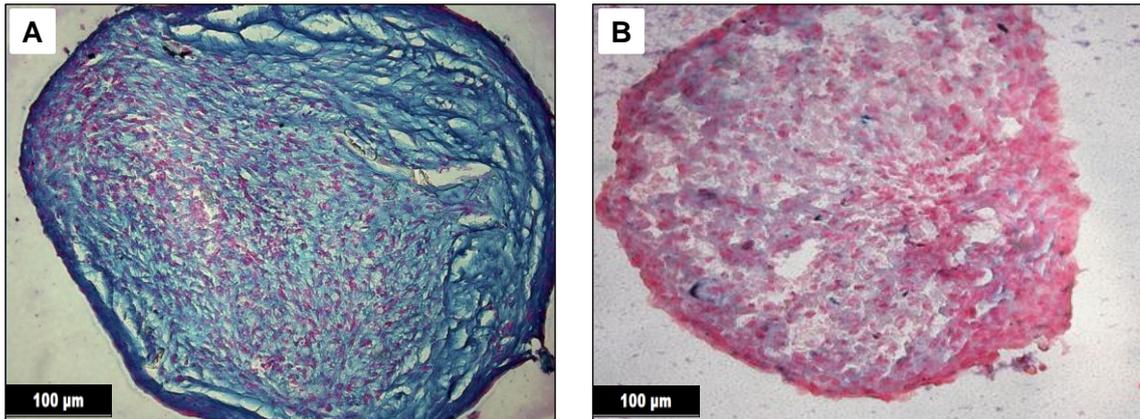


Abb. 23: Histologischer Nachweis der chondrogenen Differenzierung durch Alzianblau-Färbung

Bild **A**: Blau gefärbte Glykosaminoglykane in der Extrazellulärmatrix nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung der mesenchymalen Fettstammzellen im dreidimensionalen hochdichten Zellkugeln, Vergleichsmaßstab: 100 µm

Bild **B**: Keine Blaufärbung der Extrazellulärmatrix bei 14-tägiger Kultivierung der Zellkugeln im Expansionsmedium, Vergleichsmaßstab: 100 µm

### 3.4 Rasterelektronenmikroskopie des Polyurethan-Trägermaterials

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden die hochporösen Hohlräume des verwendeten Polyurethanschaum (AP1970D, polyMaterials, Kaufbeuren) auf ihre Interkonnektivität untersucht.

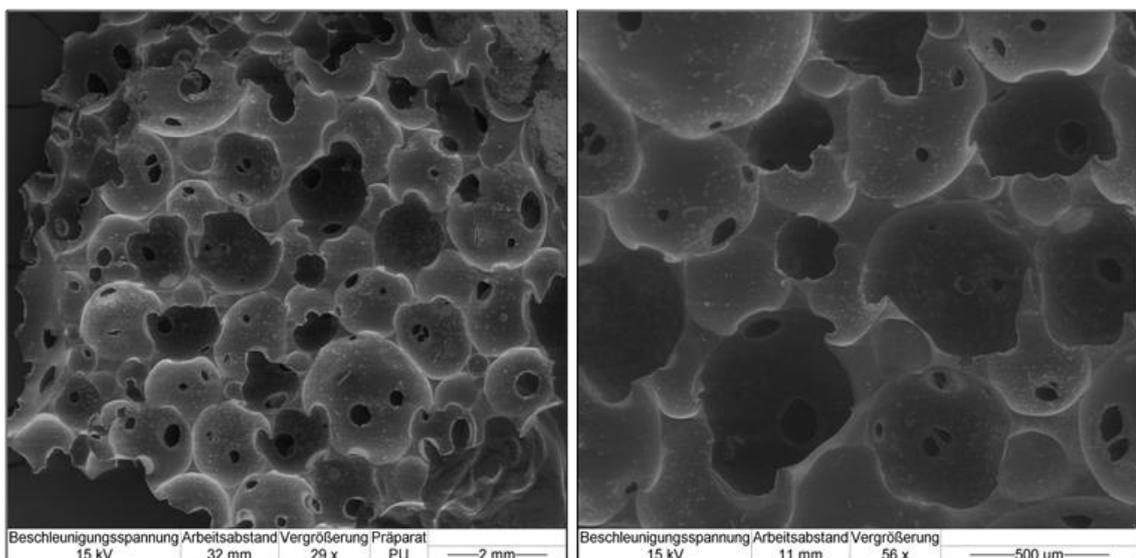


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopie des Polyurethanschaums AP1970D  
Vergleichsmaßstab: 2 mm, 500 µm

Die Rasterelektronenmikroskopie unterschiedlicher Vergrößerung (2 mm, 500 µm) ließ überwiegend große Poren mit wenigen eingelagerten kleineren

Poren erkennen. Die Öffnungen der Poren an der Oberfläche waren meist kreisförmig. Die Polymerfilme als Begrenzung einzelner benachbarter Poren zeigten eine sehr geringe Wandstärke (s. Abb. 24). Die an der freien Oberfläche mündenden vernetzten Poren sorgten für eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen und gleichzeitig für einen Abtransport der Stoffwechselprodukte.

### 3.5 Makroskopische Untersuchung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte

Polyurethan-Fibrin-Konstrukte, die im chondrogenen Differenzierungsmedium mit den Wachstumsfaktorkombinationen aus TGF- $\beta$ 3 50 ng/ml, BMP-6 500 ng/ml und IGF-I 100 ng/ml kultiviert wurden, waren formstabil. Im Laufe der 14-tägigen und 21-tägigen Kultivierung konnte weder eine Schrumpfung noch eine Größenzunahme der 5 mm breiten und 2 mm hohen Polyurethan-Fibrin-Konstrukte beobachtet werden.

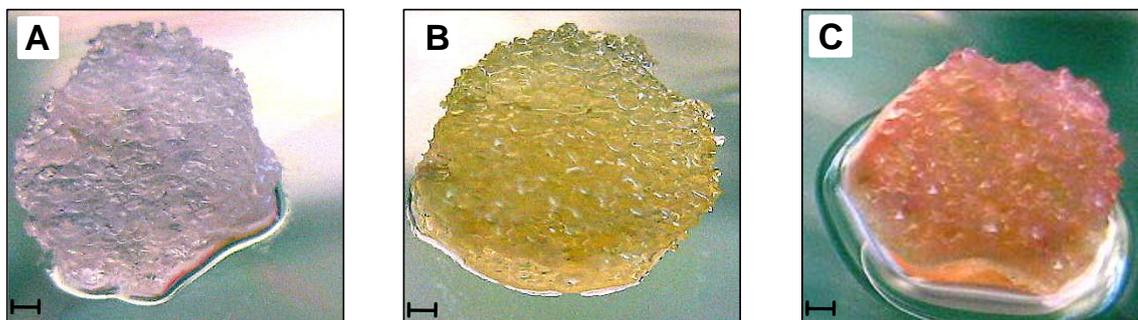


Abb. 25: Mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte

Bild **A**: Am Tag 0

Bild **B**: Nach 21-tägiger Inkubation mit DMEM

Bild **C**: Nach 21-tägiger chondrogenen Differenzierung mit I+T

Messbalkenlänge 1mm im Original

Die anfänglich weißen, frisch besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte am Tag 0 (Abb. 25, A) veränderten durch die chondrogene Differenzierung ihr Aussehen. Die zu Beginn noch porösen, schwammartigen Polyurethan-Fibrin-Konstrukte bekamen durch die chondrogene Differenzierung und Proliferation der Zellen ein kompakteres und gallertiges Aussehen (Abb. 25, C). Die Festigkeit der Konstrukte nahm nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung zu. Makroskopisch war kein Unterschied zwischen den durch verschiedene Wach-

stumsfaktorkombinationen chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukten zu erkennen. Die im Expansionsmedium kultivierten Konstrukte behielten bis zu ihrem Erntezeitpunkt das schwammartige, poröse Aussehen bei (Abb. 25, B).

### 3.6 Analyse der Genexpression mit der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

#### 3.6.1 Genexpression spezifischer Marker-Gene für hyalinen Knorpel

Der Transkriptionsfaktor SOX-9 ist ein typischer Genexpressions-Marker für die frühesten Phasen der Chondrogenese. Die untersuchten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte exprimierten SOX-9 bereits am Tag 0 (s. Abb. 26).

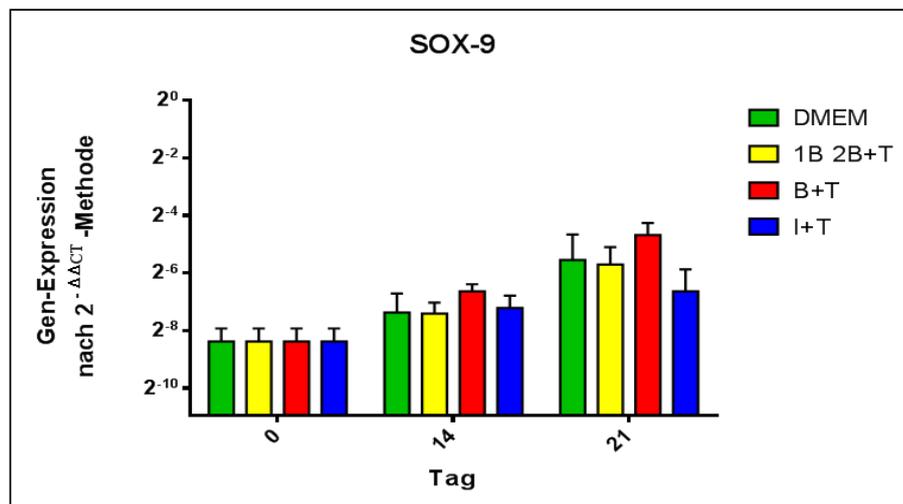


Abb. 26: Genexpression von SOX-9 nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Mittelwerte mit Standardfehlern bezogen auf GAPDH und hyalinen Nasenseptumknorpel. Auf der y-Achse ist die Genexpression mit logarithmischer Skalierung zur Basis 2 aufgetragen und auf der x-Achse die Tage 0, 14 und 21.

Startwert:  $2^{-10} = 0,0009765625$

Im Laufe der 21-tägigen Kultivierung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in DMEM und in chondrogenen Differenzierungsmedien kam es bei allen untersuchten Gruppen zu einem Anstieg der SOX-9 Expression. Sowohl am Tag 14 als auch am Tag 21 konnte bei der Wachstumsfaktorkombination B+T im Vergleich zu den drei anderen Gruppen die höchste Genexpression gemessen werden. (Abb. 26, rote Balken). Statistisch wurde die Zunahme der Genexpression von B+T am Tag 21 gegenüber Tag 0 und gegenüber DMEM, 1B2B+T und I+T am Tag 14 auf einem Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  nachgewiesen.

Bereits am Tag 0 zeigte sich eine geringe Expression des knorpelspezifischen Marker-Gens Kollagen 2 (Abb. 27, A). Durch die Wirkung der Wachstumsfaktorkombination B+T am Tag 14 wurde im Vergleich zu der Kontrollgruppe in DMEM und den 2 weiteren Wachstumsfaktorkombinationen am Tag 14 der höchste Anstieg der Expression von Kollagen 2 gemessen (Abb. 27, A, Tag 14, roter Balken). Mit Ausnahme der Kontrollgruppe in DMEM konnte in den untersuchten Gruppen ein Anstieg der Kollagen 2-Expression von Tag 14 auf Tag 21 beobachtet werden. Die Kollagen 2-Expression der Wachstumsfaktorkombination I+T hatte sich am Tag 21 signifikant gegenüber Tag 0, gegenüber allen untersuchten Medien am Tag 14 sowie gegenüber DMEM und 1B2B+T am Tag 21 erhöht (Abb. 27, A, Tag 21, blauer Balken).

Eine geringe Genexpression des knorpelspezifischen Marker-Gens Kollagen 9 zeigte sich bereits bei den mesenchymalen Fettstammzellen in den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten am Tag 0 (Abb. 27, B). Der höchste Anstieg der Genexpression am Tag 14 im Vergleich zu der Kontrollgruppe in DMEM und den Wachstumsfaktorkombinationen 1B2B+T sowie I+T am Tag 14 wurde bei der Kombination der Wachstumsfaktoren B+T beobachtet (Abb. 27, B, Tag 14, roter Balken). Die untersuchten Wachstumsfaktorkombinationen zeigten einen Anstieg der Kollagen 9-Genexpression von Tag 14 auf Tag 21. Hier zeigte die Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T die höchste Genexpression (Abb. 27, B, Tag 21, gelber Balken). Der Anstieg der Genexpression dieser Wachstumsfaktorkombination im Vergleich zu Tag 0, zu Tag 14 bei den Medien DMEM, 1B2B+T, I+T und Tag 21 bei I+T konnte statistisch bestätigt werden.

Das für hypertrophe Knorpelzellen typische Marker-Gen Kollagen 10 wurde bereits in einer geringen Menge am Tag 0 exprimiert (Abb. 27, C). Ausgehend von Tag 0 konnte in allen untersuchten Gruppen unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen und der Kontrollgruppe in DMEM ein Anstieg der Genexpression von Kollagen 10 bis Tag 21 beobachtet werden. Am Tag 14 wurde im Vergleich zu der Kontrollgruppe in DMEM und weiteren Wachstumsfaktorkombinationen bei 1B2B+T sowie I+T am Tag 14 durch Zugabe der Wachstumsfaktorkombinationen B+T der höchste Anstieg der Genexpression von Kollagen 10 gemessen (Abb. 27, C, Tag 14, roter Balken)

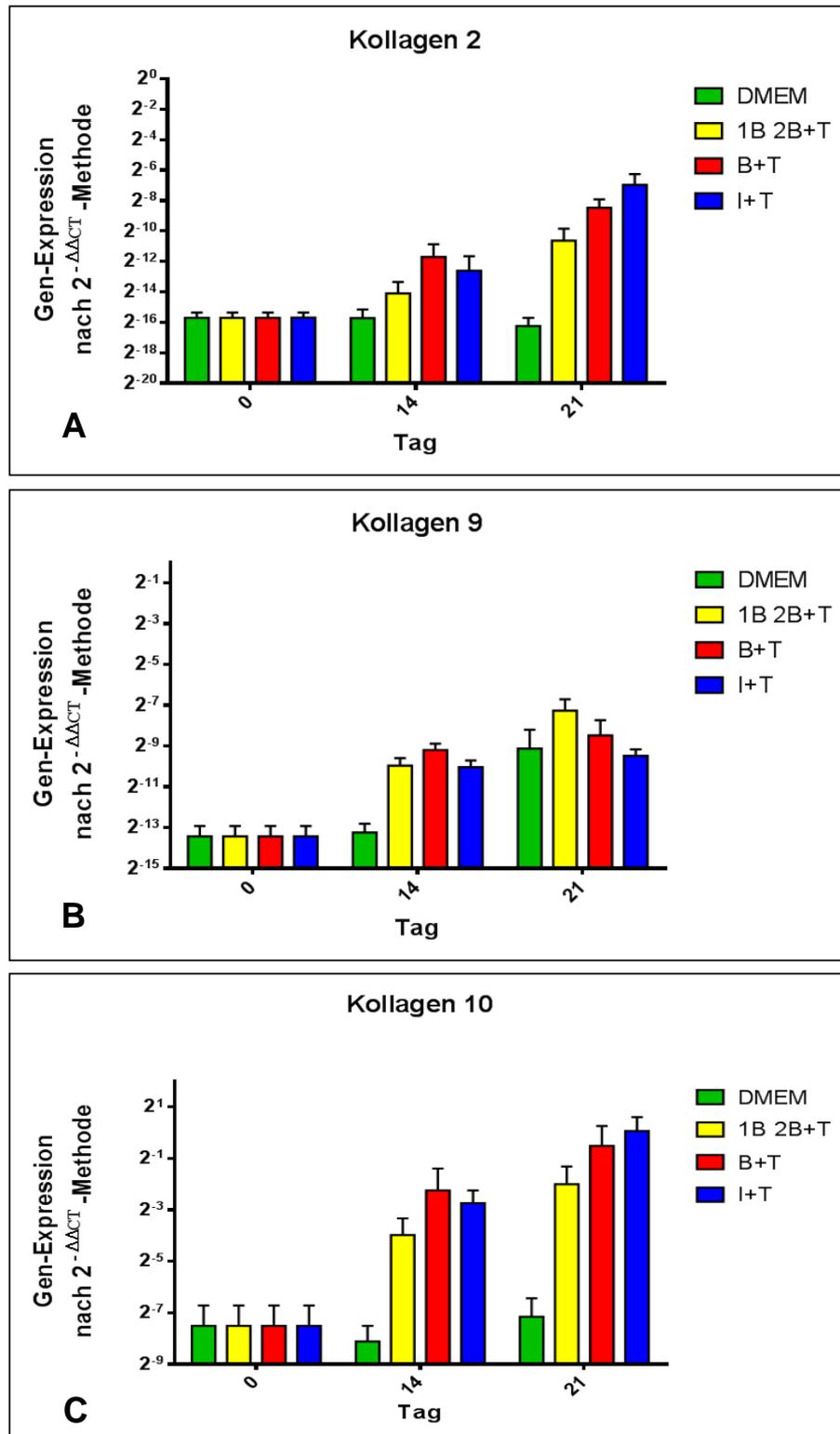


Abb. 27: Genexpression knorpelspezifischer Kollagene nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Mittelwerte mit Standardfehlern bezogen auf GAPDH und hyalinen Nasenseptumknorpel. Auf der y-Achse ist die Genexpression mit logarithmischer Skalierung zur Basis 2 aufgetragen und auf der x-Achse die Tage 0, 14 und 21.

Bild A: Genexpression von Kollagen 2. Startwert:  $2^{-20} = 0,00000095367431640625$

Bild B: Genexpression von Kollagen 9. Startwert:  $2^{-15} = 0,000030517578125$

Bild C: Genexpression von Kollagen 10. Startwert:  $2^{-9} = 0,001953125$

Bei der Wachstumsfaktorkombination I+T erhöhte sich die Genexpression von Kollagen 10 am Tag 21 signifikant im Vergleich zu Tag 0 (Abb. 27, C, Tag 21, blauer Balken). Dieser signifikante Anstieg der Genexpression von Kollagen 10 wurde statistisch gegenüber Tag 14 bei den Medien DMEM, 1B2B+T, I+T und Tag 21 bei DMEM bestätigt.

Das knorpelspezifische Marker-Gen Aggrekan wurde in geringen Mengen am Tag 0 exprimiert (Abb. 28). Am Tag 14 wurde durch die Zugabe der Wachstumsfaktorkombination B+T im Vergleich zu der Kontrollgruppe in DMEM und den Wachstumsfaktorkombinationen 1B2B+T sowie I+T am Tag 14 der höchste Anstieg der Expression von Aggrekan beobachtet (Abb. 28, Tag 14, roter Balken).

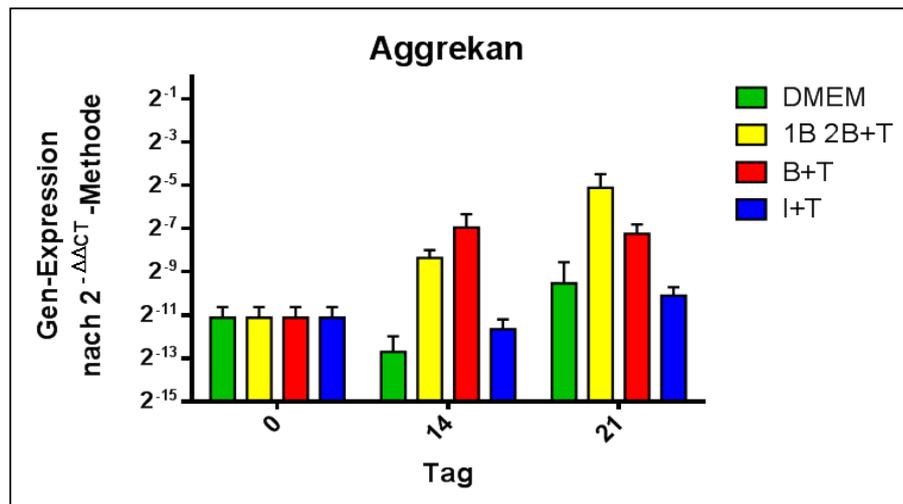


Abb. 28: Genexpression von Aggrekan nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Mittelwerte mit Standardfehlern bezogen auf GAPDH und hyalinen Nasenseptumknorpel. Auf der y-Achse ist die Genexpression mit logarithmischer Skalierung zur Basis 2 aufgetragen und auf der x-Achse die Tage 0, 14 und 21. Startwert:  $2^{-15} = 0,000030517578125$

Außer in dieser Gruppe konnte bei der Kontrollgruppe in DMEM und den anderen beiden Wachstumsfaktorkombinationen ein Anstieg der Genexpression von Tag 14 auf Tag 21 gemessen werden. Am Tag 21 erhöhte sich die Genexpression der Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T signifikant (Abb. 28, Tag 21, gelber Balken). Die am Tag 21 bei der Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T gemessene Genexpression war statistisch signifikant höher als die am Tag 0 sowie höher als die am Tag 14 bei DMEM, 1B2B+T, I+T und die am Tag 21 bei DMEM und I+T ermittelten Werte.

### 3.6.2 Genexpression eines spezifischen Marker-Gens für Faserknorpel

Das für Faserknorpel typische Kollagen 1 wurde in der verwendeten Positivkontrolle aus hyalinem Nasenseptumknorpel nur gering exprimiert. Dagegen konnte bereits am Tag 0 eine hohe Genexpression von Kollagen 1 in den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten festgestellt werden (s. Abb. 29).

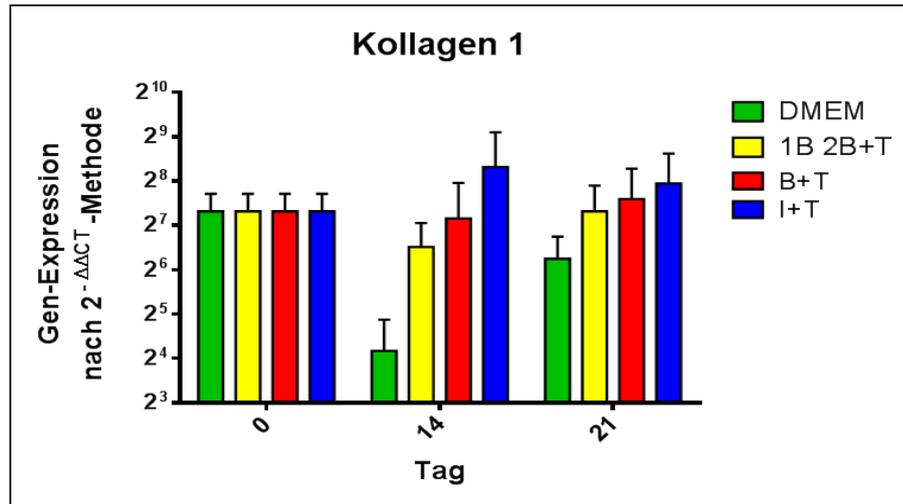


Abb. 29: Genexpression von Kollagen 1 nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Mittelwerte mit Standardfehlern bezogen auf GAPDH und hyalinen Nasenseptumknorpel. Auf der y-Achse ist die Genexpression mit logarithmischer Skalierung zur Basis 2 aufgetragen und auf der x-Achse die Tage 0, 14 und 21. Startwert:  $2^3 = 8$

Am Tag 14 wurde im Vergleich zu der Kontrollgruppe in DMEM und weiteren Wachstumsfaktorkombinationen 1B2B+T sowie B+T am Tag 14 durch Zugabe der Wachstumsfaktorkombinationen I+T der höchste Anstieg der Genexpression von Kollagen 1 gemessen (Abb. 29, Tag 14, blauer Balken). Dagegen erreichten am Tag 14 weder die Kontrollgruppe in DMEM (Abb. 29, Tag 14, grüner Balken) noch die Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T (Abb. 29, Tag 14, gelber Balken) die Genexpression von Tag 0. Am Tag 21 kam es zu einem Rückgang der Genexpression der Wachstumsfaktorkombination I+T (Abb. 29, Tag 21, blauer Balken). Die Genexpression der Kontrollgruppe in DMEM und der Kombinationen 1B2B+T sowie B+T stieg dagegen bis zum Tag 21 weiter an (Abb. 29, Tag 21). Bei dem Vergleich der Genexpression der chondrogenen Differenzierungsmedien und des Expansionsmediums konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

### 3.7 Biochemische Analyse

DNA-, Glykosaminoglykan- und Kollagen-Gehalt der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden an den Tagen 0, 14 und 21 biochemisch analysiert. Als Referenz dienten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte von Tag 0 und als Positivkontrolle humaner Nasenseptumknorpel. Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in DMEM dienten sowohl am Tag 14 als auch am Tag 21 als Kontrollgruppe.

#### 3.7.1 DNA-Gehalt

Mittels einer Natriumacetat-Fällung der DNA mesenchymaler Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten wurde ihr DNA-Gehalt in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  photometrisch bestimmt. Am Tag 14 wurde im Vergleich zu Tag 0 ein Anstieg des DNA-Gehalts um 40% bei den Wachstumsfaktorkombinationen I+T (Abb. 30, Tag 14, blauer Balken) und 1B2B+T (Abb. 30, Tag 14, gelber Balken) gemessen.

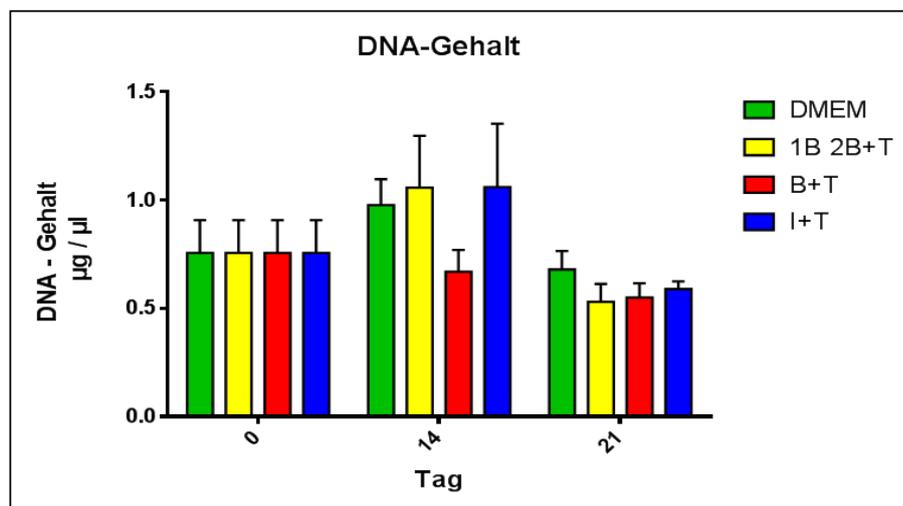


Abb. 30: DNA-Gehalt mesenchymaler Fettstammzellen in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  an den Tagen 0, 14, 21. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern.

Der DNA-Gehalt mesenchymaler Fettstammzellen, die mit der Wachstumsfaktorkombination B+T in dem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt kultiviert wurden, nahm kontinuierlich im Vergleich zu Tag 0 bis Tag 21 um 37% ab (Abb. 30, rote Balken). Am Tag 21 konnte eine generelle Abnahme des DNA-Gehalts bei allen untersuchten Gruppen unter den am Tag 0 gemessenen Wert festgestellt werden. Bei der Kontrollgruppe in DMEM war mit 10% die geringste Abnahme des DNA-Gehalts am Tag 21 im Vergleich zu Tag 0 festzustellen (Abb. 30, Tag 21, grüner Balken). Beim DNA-Gehalt zeigten sich weder zwischen den Medien am

gleichen Messtag noch zwischen den Werten an unterschiedlichen Tagen signifikante statistische Unterschiede.

### 3.7.2 Glykosaminoglykan-Gehalt

Der Anteil der Glykosaminoglykane, Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat in der Extrazellulärmatrix der mesenchymalen Fettstammzellen der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurde durch die Färbereaktion mit 1,9-Dimethylmetylen-Blau spektrometrisch quantifiziert und auf den DNA-Gehalt der Zellen bezogen. Am Tag 0 wurde in den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten eine geringe Menge an Glykosaminoglykanen nachgewiesen (Abb. 31).

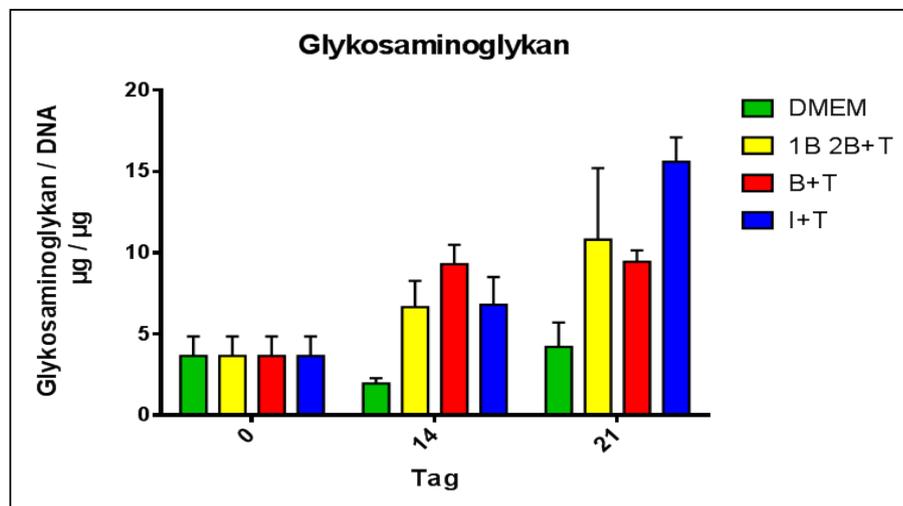


Abb. 31: Glykosaminoglykan-Gehalt mesenchymaler Fettstammzellen an den Tagen 0, 14, 21 in  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  bezogen auf den DNA-Gehalt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern.

Der Glykosaminoglykan-Gehalt der Wachstumsfaktorkombination B+T nahm am Tag 14 gegenüber Tag 0 um den Faktor 2,5 zu (Abb. 31, Tag 14, roter Balken). Bei den zwei weiteren Wachstumsfaktorkombinationen und der Kontrollgruppe in DMEM wurde ein Anstieg des Glykosaminoglykan-Gehalts von Tag 14 zum Tag 21 gemessen. Der Glykosaminoglykan-Gehalt der Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T hatte sich um den Faktor 3 (Abb. 31, Tag 21, gelber Balken) und der Gehalt der Kombination I+T (Abb. 31, Tag 21, blauer Balken) um den Faktor 4 gegenüber Tag 0 erhöht. Am Tag 14 betrug der Glykosaminoglykan-Gehalt der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte unter dem Einfluss der Wachstumsfaktorkombination B+T 11% des für humanen Nasenseptumknorpel gemessenen Glykosaminoglykan-Gehalts (Abb. 31, Tag 14, roter Bal-

ken). Am Tag 21 erreichte der Glykosaminoglykan-Gehalt der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte durch die Wachstumsfaktorkombination I+T 17% des Glykosaminoglykan-Gehalts von hyalinem Nasenseptumknorpel (Abb. 31, Tag 21, blauer Balken). Eine statistisch signifikante Zunahme des Glykosaminoglykan-Gehalts wurde bei dieser Wachstumsfaktorkombination im Vergleich zu Tag 0, Tag 14 DMEM, 1B2B+T, I+T und zu Tag 21 DMEM bestätigt. Auch die Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T zeigte einen signifikanten Anstieg des Glykosaminoglykan-Gehalts im Vergleich zu den für 14 Tage in DMEM kultivierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukten.

### 3.7.3 Kollagen-Gehalt

Die Kollagene in der Extrazellulärmatrnx der mesenchymalen Fettstammzellen in den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten wurden durch Picro-Sirius Red gefärbt und die Rotfärbung anschließend spektrometrisch analysiert. Der spektrometrisch gemessene Kollagen-Gehalt wurde in Bezug auf den DNA-Gehalt der Zellen dargestellt.

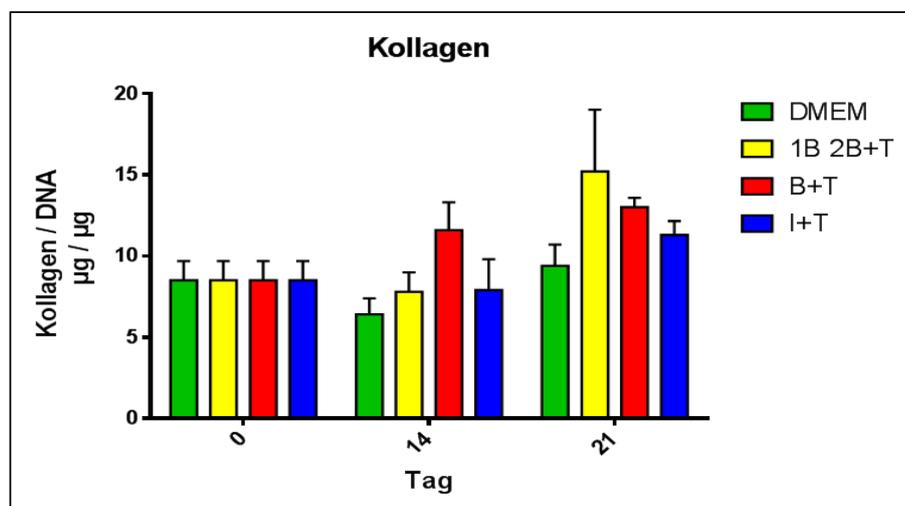


Abb. 32: Kollagen-Gehalt mesenchymaler Fettstammzellen an den Tagen 0, 14, 21 in  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  bezogen auf den DNA-Gehalt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern.

Der bereits am Tag 0 gemessene Kollagen-Gehalt wurde nur durch die Wachstumsfaktorkombination B+T um den Faktor 1,4 am Tag 14 übertroffen (Abb. 32, Tag 14, roter Balken). Der Kollagen-Gehalt stieg in allen untersuchten Gruppen von Tag 14 zum Tag 21 an. Den signifikant höchsten Kollagen-Gehalt verzeichnete am Tag 21 die Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T mit einer Erhöhung des Kollagen-Gehalts um den Faktor 1,8 im Vergleich zum Tag 0

(Abb. 32, Tag 21, gelber Balken). Der Kollagen-Gehalt der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte, die für 14 und 21 Tage mit der Kombination B+T kultiviert wurden, erreichte am Tag 14 36% und am Tag 21 39% des Kollagen-Gehalts von humanen Nasenseptumknorpels (Abb. 32, rote Balken). Den prozentual höchsten Kollagen-Gehalt im Vergleich zu humanem Nasenseptumknorpel erzielte am Tag 21 mit 46% die Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T (Abb. 32, Tag 21, gelber Balken). Bei dieser Wachstumsfaktorkombination wurde ein statistisch signifikanter Anstieg des Kollagen-Gehalts gegenüber Tag 14 bei DMEM, 1B2B+T und I+T ermittelt.

### 3.8 Histologische Untersuchung

Am Tag 21 der chondrogenen Differenzierung wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte durch 4%-iges Paraformaldehyd fixiert und für die Anfertigung von Gefrierschnitten vorbereitet. Bei der Vorbereitung der Konstrukte musste darauf geachtet werden, dass der Polyurethanschaum vollständig mit den zähflüssigen Konservierungstoffen durchtränkt war. Trotz langer Inkubation in 30%-iger Glukose-Lösung und Tissue-Tek® O.C.T.™ konnten keine vollständigen, durchgehenden Gefrierschnitte des Polyurethan-Fibrin-Gewebes angefertigt werden. Vor allem bei den Konstrukten, die im Expansionsmedium kultiviert wurden, zerrissen die Gefrierschnitte, sobald man den spröden Polyurethanschaum anschnitt. Auch durch Variation der Temperatur, durch schärfere Klingen des Schneidemessers oder durch Anfertigung von Paraffinschnitten ließen sich keine besseren Ergebnisse erzielen. Durch die Ruptur des spröden Polyurethanschaums konnten nur Gewebeausschnitte beurteilt werden. Eine Beurteilung der chondrogenen Differenzierung erfolgte rein visuell deskriptiv anhand der durchgeführten histologischen Färbungen des Gewebes. Als Beispiel für das Aussehen eines fast vollständig erhaltenen Polyurethan-Fibrin-Konstruktes dienen histologisch gefärbte Gefrierschnitte der Wachstumsfaktorkombination I+T. Anhand dieser Gefrierschnitte ließen sich Partikel des Polyurethanschaums (Abb. 33, B) und dazwischen liegende mit Zellen besiedelte Fibrin-Hydrogel-Areale erkennen.

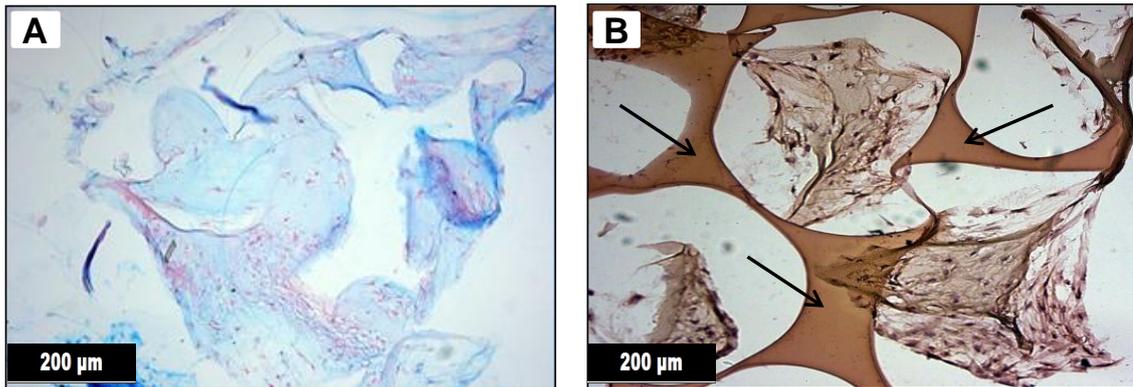


Abb. 33: Polyurethan-Fibrin-Konstrukte nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung mit I+T  
 Bild **A**: Alzianblau-Färbung  
 Bild **B**: Safranin O-Färbung, Pfeilspitzen zeigen auf Partikel des Polyurethanschaums  
 Vergleichsmaßstab: 200 µm

Die folgenden histologischen Bilder zeigen gefärbte Gefrierschnitte von Polyurethan-Fibrin-Konstrukten, besiedelt mit mesenchymalen Fettstammzellen einer Patientin. Als Positivkontrolle dienten Gefrierschnitte von humanem Nasenseptumknorpel und als Negativkontrolle nicht besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte.

### 3.8.1 Alzianblau-Färbung

Durch den Farbstoff Alzianblau werden Proteoglykane der Extrazellulärmatrix von hyalinem Knorpel blau angefärbt. Die Zellkerne der hyalinen Knorpelzellen in ihrer Knorpelhöhle wurden durch Kernechtrot rötlich gefärbt. Der Knorpelhof und die Umgebung der Knorpelhöhlen, genannt Territorium, wurden aufgrund ihres höheren Proteoglykan-Anteils durch die Alzianblau-Färbung kräftiger blau gefärbt als die interterritoriale Knorpelgrundsubstanz (Abb. 34, A). Dagegen konnte bei Polyurethan-Fibrin-Konstrukten ohne Zellbesiedelung keine Blaufärbung beobachtet werden (Abb. 34, B). Bei Polyurethan-Fibrin-Konstrukten, die in DMEM kultiviert wurden, konnte eine Blaufärbung der Extrazellulärmatrix nicht nachgewiesen werden. Die Zellkerne der mesenchymalen Fettstammzellen und das besiedelte Fibrin-Hydrogel wiesen eine rosa Färbung auf (Abb. 34, C). Dagegen färbte sich die Extrazellulärmatrix der durch unterschiedliche Wachstumsfaktorkombinationen chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen blau an (Abb. 34, D-F).

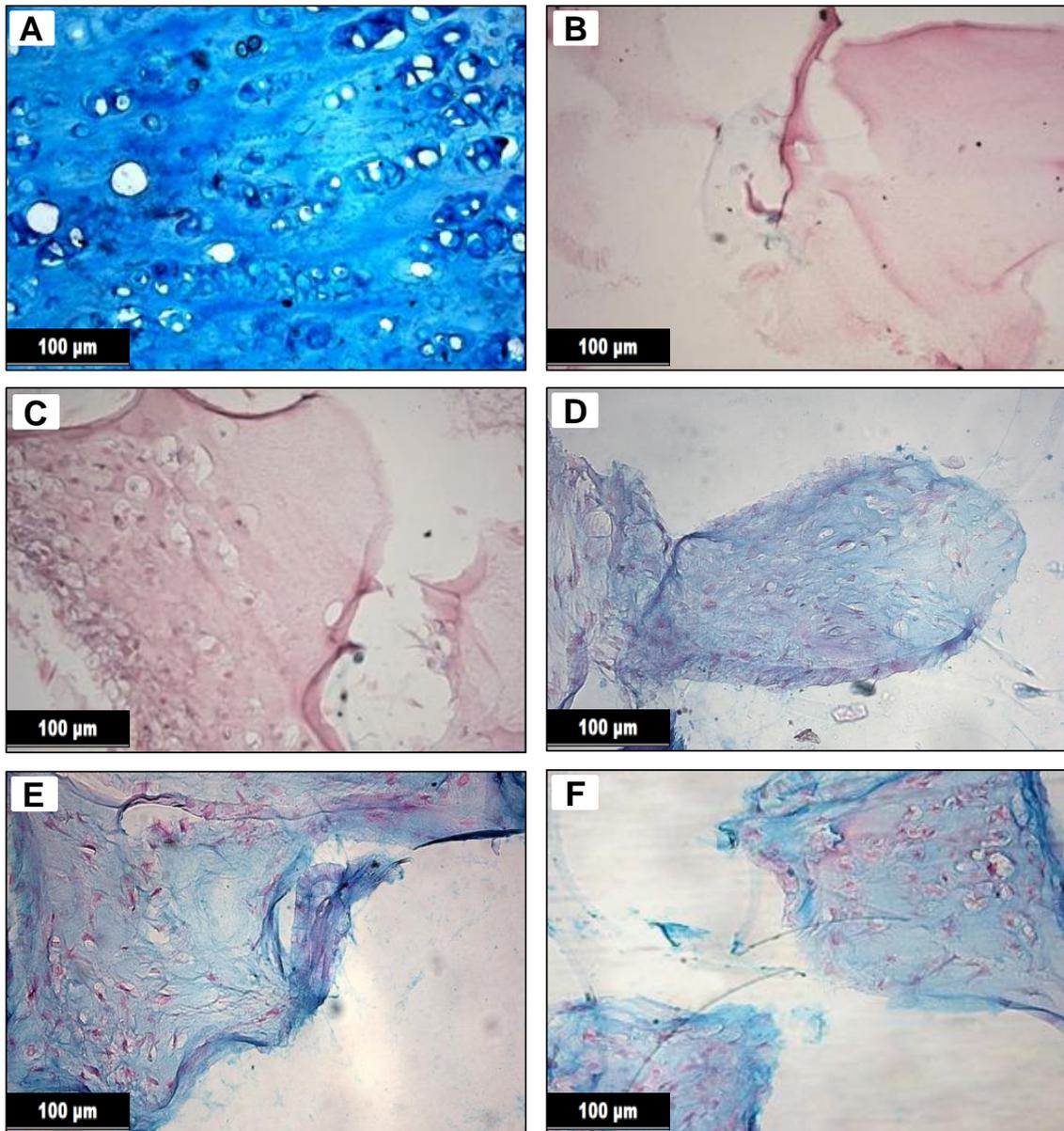


Abb. 34: Alcianblau-Färbung

Bild **A**: Positivkontrolle, humaner Nasenseptumknorpel. Bild **B**: Negativkontrolle, unbesiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **C**: Mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 21-tägiger Inkubation in DMEM. Bild **D**: Mit 1B2B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **E**: Mit B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **F**: Mit I+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Vergleichsmaßstab: 100 µm

Ein Unterschied zwischen der Intensität der Blaufärbung bei den unterschiedlichen Wachstumsfaktorkombinationen konnte nicht festgestellt werden. Sichtbar waren rötlich gefärbte Zellkerne der differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen in blasigen Gewebehöhlen, ähnlich der Anordnung von Knorpelzellen im hyalinen Knorpel. Bei allen untersuchten besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukten konnte eine Zunahme der Zelldichte in der Peripherie des Fibrin-Hydrogels unabhängig vom Kulturmedium beobachtet werden.

### 3.8.2 Safranin O-Färbung

Die Intensität der Rotfärbung durch den Farbstoff Safranin verhält sich proportional zu dem Proteoglykan-Anteil der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen. Der hyaline Nasenseptumknorpel wurde durch Safranin O intensiv rot angefärbt (Abb. 35, A). Auch bei dieser Färbung war eine Zunahme der Farbtintensität in der Umgebung von Knorpelhöhlen zu erkennen.

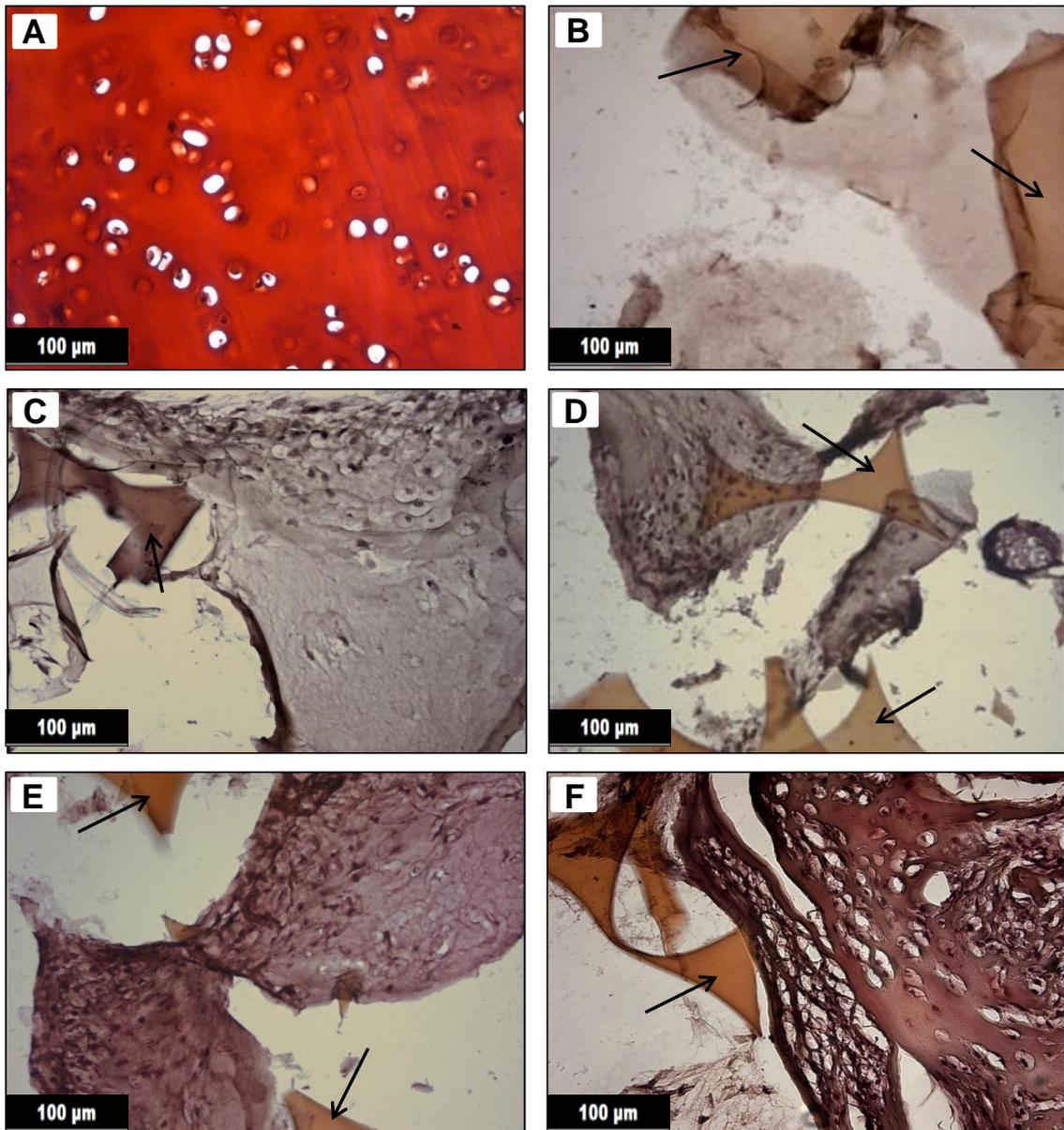


Abb. 35: Safranin O-Färbung, Die Pfeilspitzen in den Bildern B-F zeigen auf Partikel des Polyurethanschaums. Bild **A**: Positivkontrolle, humaner Nasenseptumknorpel. Bild **B**: Negativkontrolle, unbesiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **C**: Mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 21-tägiger Inkubation in DMEM. Bild **D**: Mit 1B2B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **E**: Mit B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **F**: Mit I+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Vergleichsmaßstab: 100 µm

Die Zellkerne der Knorpelzellen in den Knorpelhöhlen wurden durch Eisenhämatoxylin nach Weigerts dunkelbraun gefärbt. Im Gegensatz zu dem sehr rot gefärbten hyalinen Nasenseptumknorpel nahm das Polyurethan-Fibrin-Konstrukt ohne Zellen keine rote Farbe an und erschien eher braun (Abb. 35, B). Auch die Partikel des Polyurethanschaums nahmen den Safranin O-Farbstoff auf und färbten sich in unterschiedlichen Brauntönen. Bei den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten, die in DMEM kultiviert wurden, konnte nur eine Braunfärbung der Extrazellulärmatrix ohne jeglichen Rotanteil festgestellt werden (Abb. 35, C). Auch bei der Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T zeigte sich kein Rotanteil in der Extrazellulärmatrix (Abb. 35, D). Durch die Zugabe der Wachstumsfaktorkombinationen B+T sowie I+T konnte eine Zunahme des Rotanteils in der Extrazellulärmatrix der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte beobachtet werden (Abb. 35, E, F). Die knorpelähnliche Anordnung der differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen in blasenförmigen Gewebehöhlen ließ sich ebenfalls durch die Safranin O-Färbung nachweisen, zudem vergrößerte sich die Zelldichte radial von der Fibrin-Hydrogel-Mitte zur Peripherie.

### 3.9 Chromogene immunhistochemische Untersuchung

Die Bilder der chromogenen Immunhistochemie von Anti-Kollagen 2 und Anti-Aggrekan zeigen aufgrund der Braunfärbung des zellbesiedelten Fibrin-Hydrogels die Umwandlung des Chromogensubstrats 3'3 Diaminobenzidin durch die Meerrettich-Peroxidase ohne Gegenfärbung mit Nuclear-Fast-Green (s. Abb. 36). Die Partikel des Polyurethanschaums wurden dabei ebenfalls bräunlich angefärbt. Die folgenden histologischen Bilder der chromogenen Immunhistochemie zeigen Gefrierschnitte von Polyurethan-Fibrin-Konstrukten besiedelt mit mesenchymalen Fettstammzellen einer Patientin.

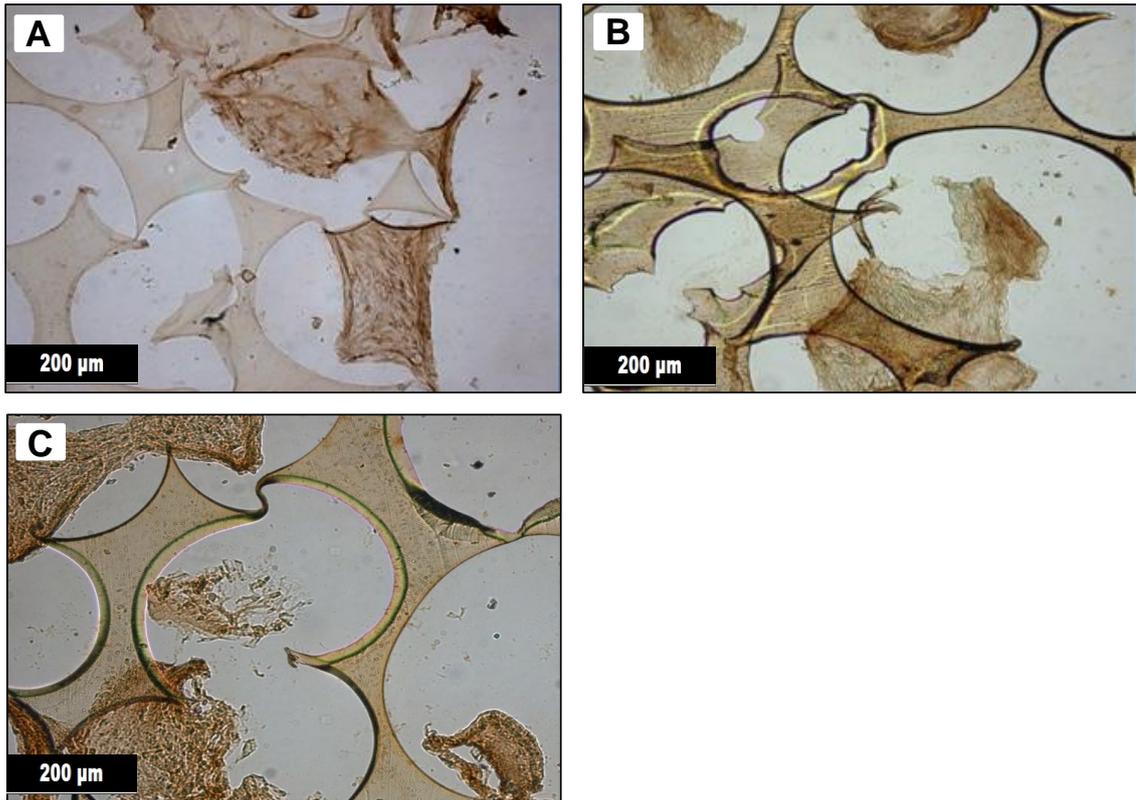


Abb. 36: Chromogene Immunhistochemie von Polyurethan-Fibrin-Konstrukten nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung mit I+T

Bild **A**: Nachweis von SOX-9 in den Zellkernen der chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen.

Bild **B**: Nachweis von Kollagen 2 in der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen.

Bild **C**: Nachweis von Aggrekan in der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen.

Vergleichsmaßstab: 200 µm

### 3.9.1 SOX-9

Der Transkriptionsfaktor SOX-9, der eine wichtige Rolle in der Chondrogenese spielt, konnte durch die chromogene Immunhistochemie in Knorpelzellen nachgewiesen werden (Abb. 37, A). Die Zellkerne der Knorpelzellen färbten sich in den Knorpelhöhlen dunkelbraun an. Bei der Negativkontrolle war keine Antikörper-Antigen-Reaktion zu beobachten (Abb. 37, B).

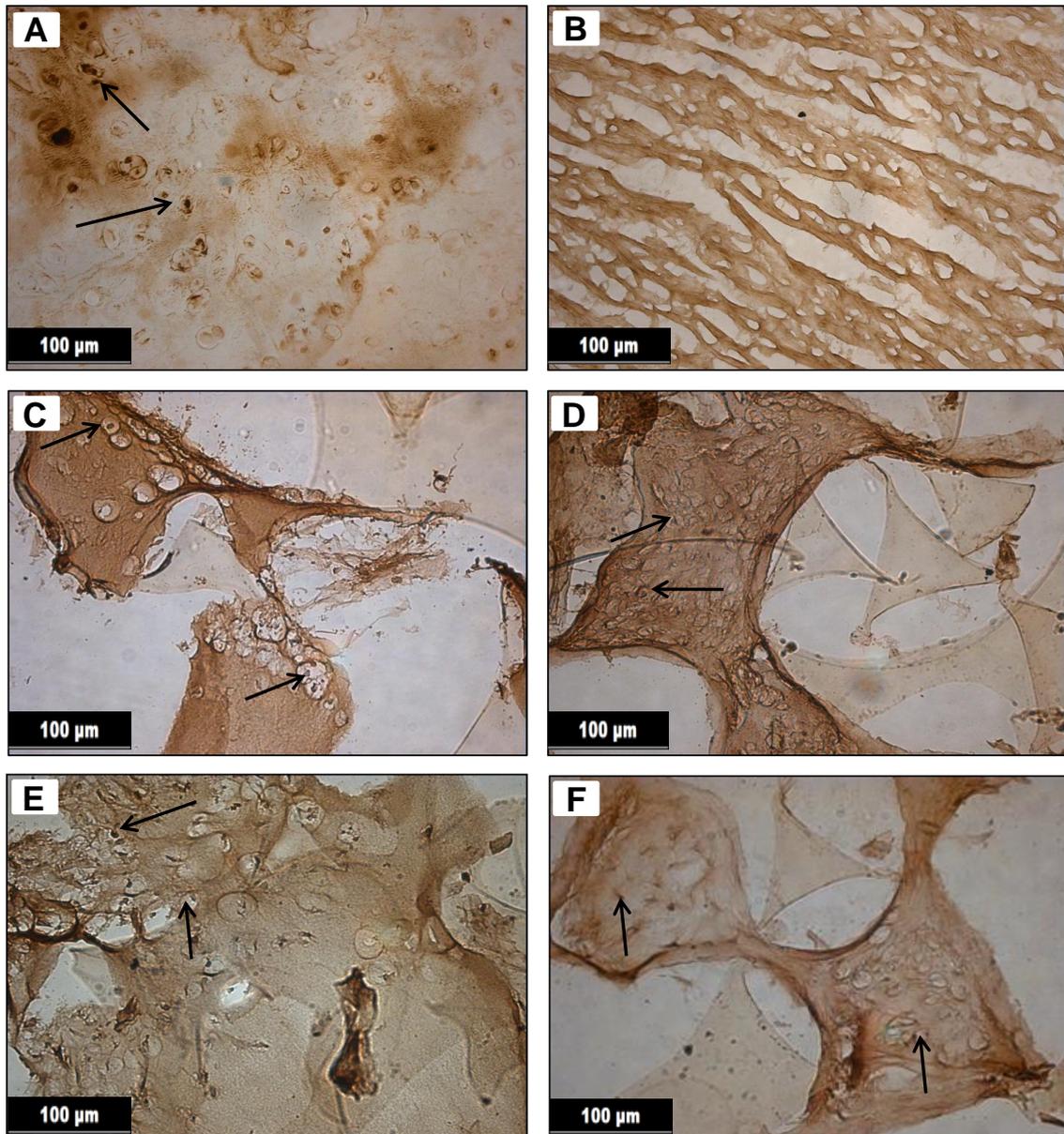


Abb. 37: SOX-9-spezifische chromogene Immunhistochemie  
 Die Pfeilspitzen in den Bildern A,C-F zeigen die Antikörper-Antigen-Reaktion in den Zellkernen. Bild **A**: Positivkontrolle, humaner Nasenseptumknorpel. Bild **B**: Negativkontrolle, Muskelgewebe vom Huhn. Bild **C**: Mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 21-tägiger Inkubation in DMEM. Bild **D**: Mit 1B2B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **E**: Mit B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **F**: Mit I+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Vergleichsmaßstab: 100 µm

Bei den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten wurde sowohl bei der Kontrollgruppe in DMEM als auch bei den einzelnen Wachstumsfaktorkombinationen SOX-9 in den Zellkernen der mesenchymalen Fettstammzellen nachgewiesen (Abb. 37, C-F). Mesenchymale Fettstammzellen ähnelten nach der dunkelbraunen Anfärbung der Zellkerne im Aussehen Knorpelzellen in Knorpelhöhlen. Bei der Kon-

trollgruppe in DMEM und der Wachstumsfaktorkombination B+T nahm die Zelldichte in den Randbereichen des Fibrin-Hydrogels zu (Abb. 37, C, E).

### 3.9.2 Kollagen 2

Die Kollagen 2-spezifische chromogene Immunhistochemie zeigte eine positive Braunfärbung der Extrazellulärmatrrix des humanen Nasenseptumknorpels (Abb. 38, A).

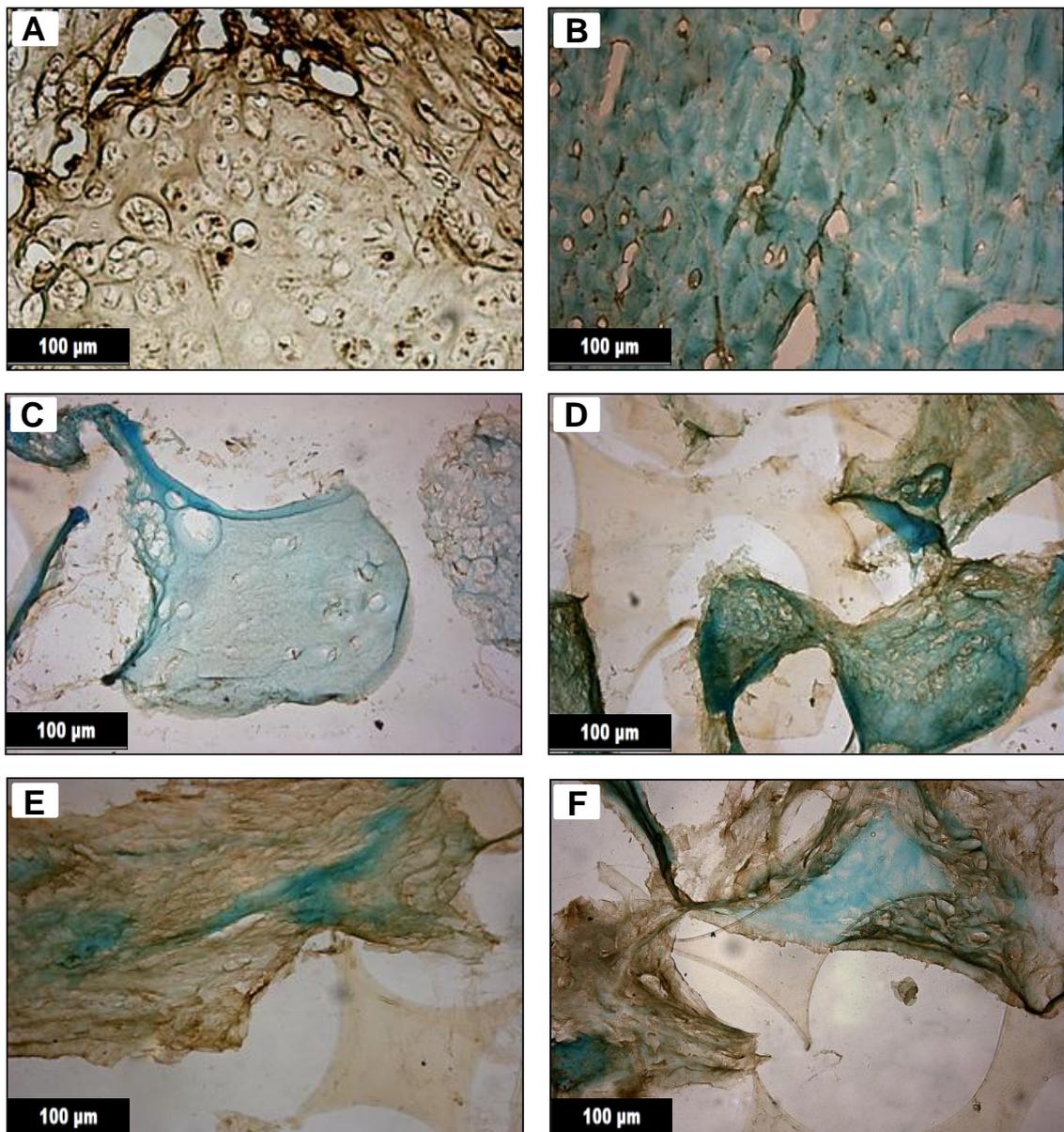


Abb. 38: Kollagen 2-spezifische chromogene Immunhistochemie  
 Bild **A**: Positivkontrolle, humaner Nasenseptumknorpel. Bild **B**: Negativkontrolle, Muskelgewebe vom Huhn. Bild **C**: Mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 21-tägiger Inkubation in DMEM. Bild **D**: Mit 1B2B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **E**: Mit B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **F**: Mit I+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Vergleichsmaßstab: 100 µm

Der hohe Bindegewebeanteil in der Negativkontrolle dagegen färbte sich grün durch das Nuclear-Fast-Green (Abb. 38, B). Bei der Kontrollgruppe in DMEM konnte keine positive Kollagen 2-spezifische Braunfärbung der Extrazellulärmatrix festgestellt werden (Abb. 38, C). Das mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedelte Fibrin-Hydrogel färbte sich grün. Auch bei der Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T überwog eine Grünfärbung des besiedelten Fibrin-Hydrogels mit vereinzelt positiv-braun angefärbten Gewebearealen im Hintergrund (Abb. 38, D). Eine positive Kollagen 2-spezifische Braunfärbung mit der geringsten Grünfärbung der extrazellulären Matrix der differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen wurde bei den Wachstumsfaktorkombinationen B+T sowie I+T beobachtet, zudem waren ganze Gewebeareale durchgehend positiv braun angefärbt (Abb. 38, E, F).

### 3.9.3 Aggrekan

Das knorpelspezifische Proteoglykan Aggrekan wurde immunhistochemisch in der Extrazellulärmatrix von Knorpelzellen nachgewiesen (Abb. 39, A). Die Knorpelgrundsubstanz des hyalinen Nasenseptumknorpels färbte sich durch die Aggrekan-spezifische chromogene Immunhistochemie braun, dagegen nahm das Muskelgewebe nur den grünen Farbstoff Nuclear-Fast-Green an (Abb. 39, A, B). Eine Aggrekan-spezifische Braunfärbung der extrazellulären Matrix mesenchymaler Fettstammzellen konnte bei der Kontrollgruppe in DMEM nicht nachgewiesen werden (Abb. 39, C). Das am Rande mit Zellen besiedelte Fibrin-Hydrogel färbte sich grün. Unter einem grünlichen Farbschleier des Nuclear-Fast-Green-Farbstoffes ließ sich bei allen Wachstumsfaktorkombinationen eine braune Anfärbung der Extrazellulärmatrix im Fibrin-Hydrogel erkennen (Abb. 39, D-F). Diese positive Braunfärbung überwog jedoch bei der Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T und bei der Kombination I+T (Abb. 39, D, F).

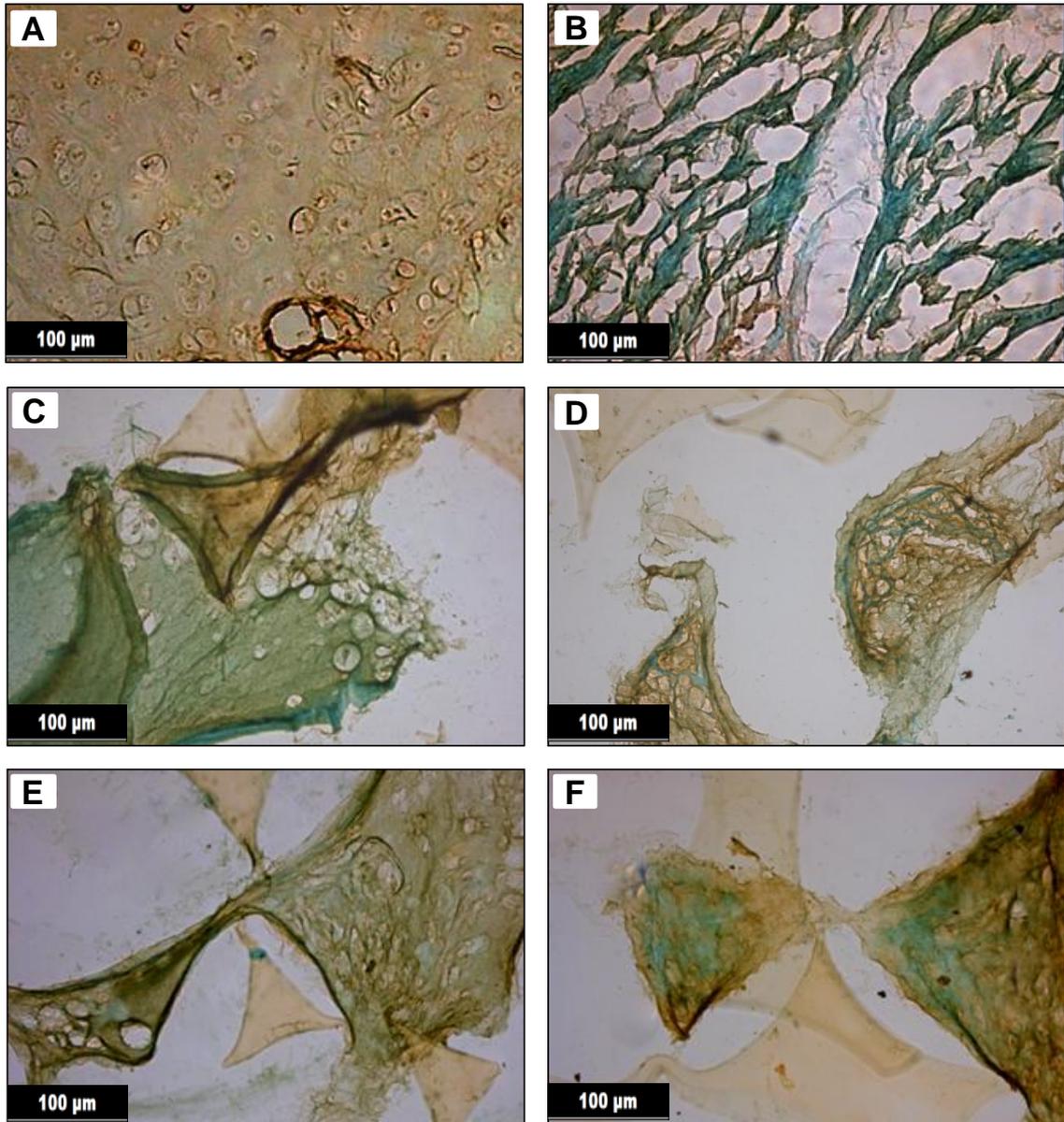


Abb. 39: Aggrekan-spezifische chromogene Immunhistochemie  
 Bild **A**: Positivkontrolle, humaner Nasenseptumknorpel. Bild **B**: Negativkontrolle, Muskelgewebe vom Huhn. Bild **C**: Mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedeltes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 21-tägiger Inkubation in DMEM. Bild **D**: Mit 1B2B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **E**: Mit B+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild **F**: Mit I+T chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Vergleichsmaßstab: 100 µm

### 3.10 Analyse der Kaninchenohr-Biopsien

Nach 3 und 6 Wochen wurden die implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte samt angrenzendem Knorpel aus der Kaninchenohrmuschel entnommen. Pro Kaninchen (n = 6) wurden zwei Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in die Ohrmuscheln implantiert. Die Kaninchenohr-Biopsien wurden anschließend sowohl makroskopisch als auch histologisch untersucht.

### 3.10.1 Makroskopische Untersuchung 3 und 6 Wochen nach Implantation

Die Kaninchen nahmen in diesem Zeitraum an Gewicht zu und ihr Allgemeinzustand war stabil. Bereits nach einer Woche wurde eine Wundheilung frei von Entzündungszeichen beobachtet. Eine Befestigung der implantierten Konstrukte mit einer Matratzennaht und ein darüber liegender Nahtverschluss der dünnen Haut konnten nicht verhindern, dass zwei der sechs Implantate sich innerhalb der ersten Woche vollständig aus dem Knorpeldefekt herauslösten. Die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden durch die dünne Hautschicht ertastet. In der Implantat-Region erschien die rosa Haut leicht gewölbt, aber nicht gerötet (Abb. 40, A). Der Gesundheitszustand der Kaninchen war auch während der folgenden 3 Wochen stabil. Nach 6 Wochen wurden keine Entzündungszeichen oder Nekrosen des Gewebes in der Implantat-Region beobachtet. Nur eines der sechs Implantate hatte sich innerhalb dieser 6 Wochen aus dem Knorpeldefekt herausgelöst und ragte aus der Hautschicht. Die rosafarbene Haut wölbte sich nur leicht und die darunterliegenden Konstrukte waren kaum zu ertasten (Abb. 40, B).

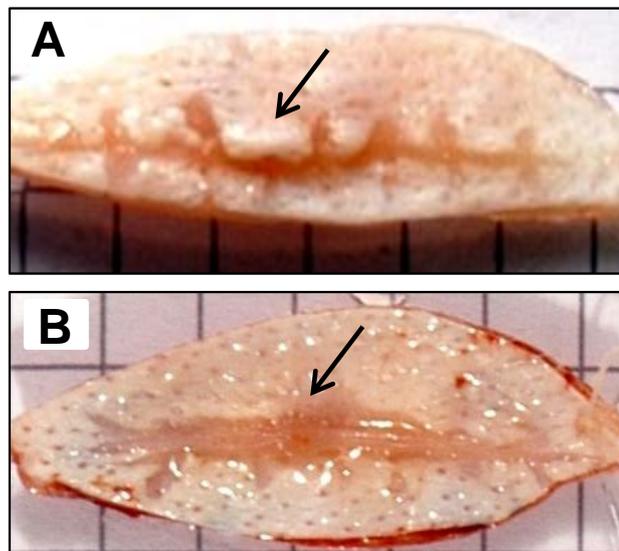


Abb. 40: In der Kaninchenohrmuschel implantierte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte  
Bild **A**: Konstruktentnahme 3 Wochen nach Implantation, entzündungsfreie Narbenbildung. Pfeilspitze zeigt auf gewölbtetes Hautareal über dem implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukt.

Bild **B**: Konstruktentnahme 6 Wochen nach Implantation, fortgeschrittene Narbenbildung. Pfeilspitze zeigt auf nachlassende Wölbung der Hautareale über dem implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. Bild A und B: Original Maßstab 5 mm Karo als Hintergrund

### 3.10.2 Histologische Untersuchung der chondrogen vordifferenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte vor Implantation

Die chondrogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen *in vitro* erfolgte vor der Implantation durch die Wachstumsfaktorkombination 1B2B+T.

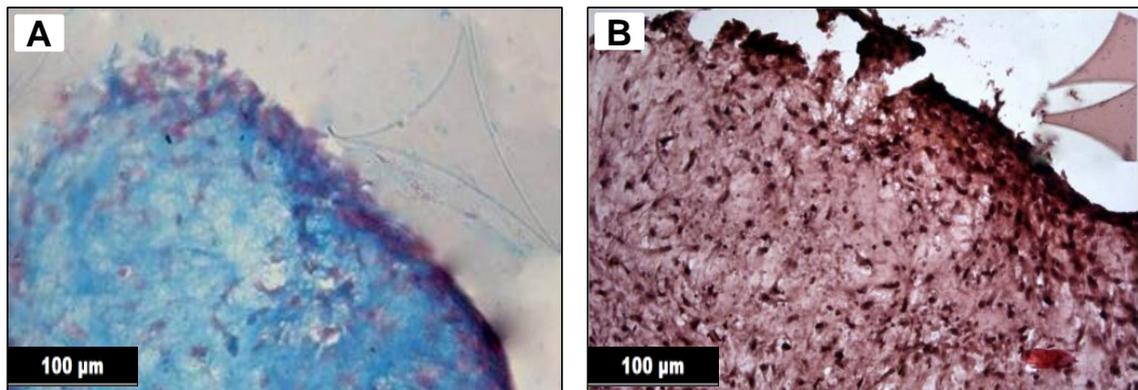


Abb. 41: Chondrogen differenzierte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte vor der Implantation in die Kaninchenohrmuschel.

Bild **A**: Alcianblau-Färbung

Bild **B**: Safranin O-Färbung

Vergleichsmaßstab: 100 µm

Präoperativ angefertigte Gefrierschnitte wurden mit Alcianblau und Safranin O gefärbt. Die Extrazellulärmatrix der differenzierten mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen färbte sich durch Alcianblau bläulich und durch die Safranin O-Färbung rötlich (s. Abb. 41).

### 3.10.3 Histologische Untersuchung 3 Wochen nach Implantation

Die entnommenen Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden samt angrenzendem Ohrmuschelknorpel histologisch untersucht. Gefrierschnitte des Gewebes wurden mit Alcianblau und Safranin O gefärbt. Anhand histomorphologischer Kriterien wurden die implantierten Konstrukte auf ihre Eingliederung und entstehender Knorpel hinsichtlich Qualität und Quantität untersucht. Hierbei wurde die Zellmorphologie der differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen auf Ähnlichkeit zu Knorpelzellen analysiert. Durch die Alcianblau- und Safranin O-Färbung wurde der Glykosaminoglykan-Gehalt der Extrazellulärmatrix der Fettstammzellen in dem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt dargestellt und mit dem vorhandenen Knorpelgewebe verglichen. Zudem wurde die Integration des Polyurethan-Fibrin-Konstruktes in das angrenzende Knorpelgewebe untersucht.

Auch bei den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten, die für 3 Wochen in das Gewebe der Kaninchenohrmuschel implantiert wurden, konnte bei der Anfertigung der Gefrierschnitte eine Ruptur des spröden Polyurethanschaums nicht vermieden werden. Jedoch bildeten sich in den Gefrierschnitten der implantierten Konstrukte im Vergleich zu *in vitro* kultivierten Konstrukten weniger Risse aus. Nur noch vereinzelt Polyurethanschaum-Partikel waren zwischen den mit Zellen besiedelten Fibrin-Hydrogel-Arealen zu erkennen. Die differenzierten mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen im Fibrin-Hydrogel lagerten sich direkt an den Knorpel an. Durch die zunehmende Proliferation und die Differenzierung der an den Knorpel angrenzenden Fettstammzellen wurden beide Knorpelsegmente fast vollständig miteinander verbunden. Die fehlenden Polyurethanschaum-Partikel erschwerten die Beurteilung der Integration des implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstruktes. An den Knorpel angrenzende zellbesiedelte Areale sowie Areale im Inneren des implantierten Konstruktes wurden durch die Alzianblau-Färbung stärker blau angefärbt als die Randbereiche des Konstruktes (s. Abb. 42). Das gesamte implantierte Konstrukt nahm durch die Safranin O-Färbung eine leicht rötliche Färbung an (s. Abb. 43).

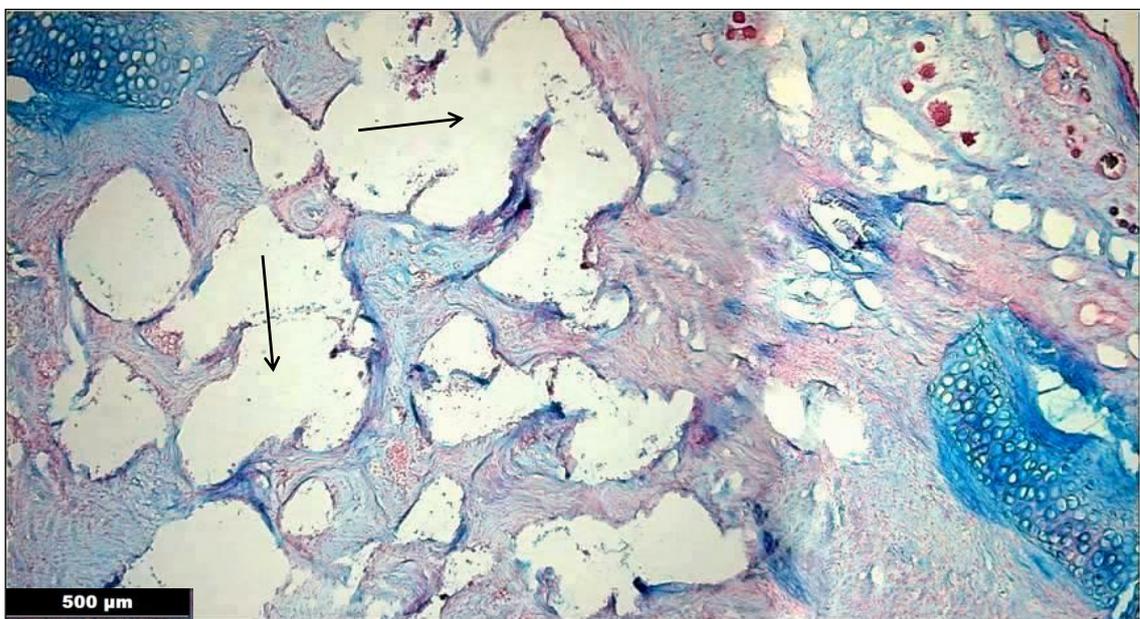


Abb. 42: Alzianblau-Färbung  
Chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 3-wöchiger Implantation in die Kaninchenohrmuschel. Pfeilspitzen zeigen auf leere Areale an denen der Polyurethanschaum gerissen ist.  
Vergleichsmaßstab: 500 µm

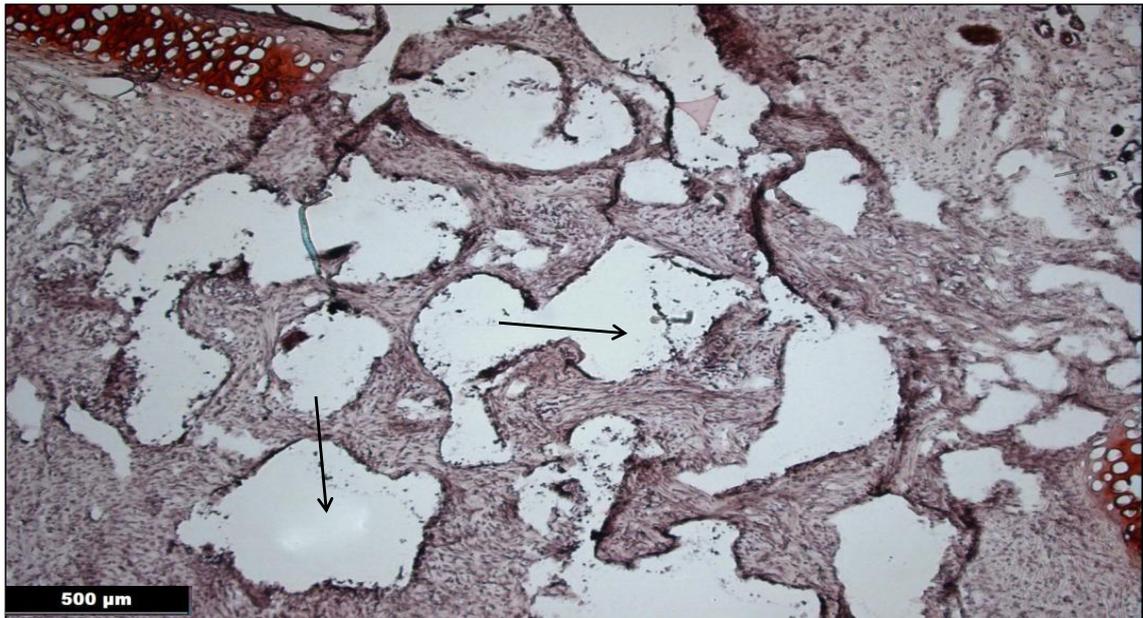


Abb. 43: Safranin O-Färbung  
Chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 3-wöchiger Implantation in die Kaninchenohrmuskel. Pfeilspitzen zeigen auf leere Areale an denen der Polyurethanschaum gerissen ist.  
Vergleichsmaßstab: 500 µm

Die Vergrößerung eines an den Knorpel angrenzenden Gewebeausschnittes veranschaulicht die zunehmende Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen in dem Fibrin-Hydrogel. Die Extrazellulärmatrix um die zahlreichen rosa gefärbten Zellkerne der differenzierten Fettstammzellen färbte sich durch die Alzianblau-Färbung bläulich (Abb. 44, A).

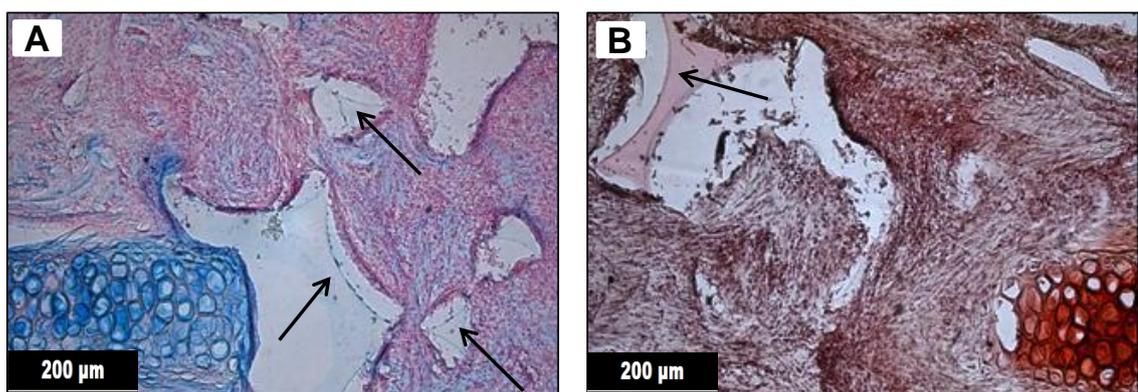


Abb. 44: Gewebeausschnitt des knorpelnahen Polyurethan-Fibrin-Konstrukts 3 Wochen nach Implantation. Pfeilspitzen zeigen auf Partikel des Polyurethanschaums.  
Bild **A**: Alzianblau-Färbung  
Bild **B**: Safranin O-Färbung  
Vergleichsmaßstab: 200µm

Auch die Safranin O-Färbung ergab einen leicht rötlichen Farbton der Extrazellulärmatrix der knorpelnahen differenzierten Fettstammzellen (Abb. 44, B). We-

der eine knorpelähnliche Zellmorphologie noch die bei Knorpel beobachtete Intensität der Alzianblau- und Safranin O-Färbung konnte in diesem Stadium des *in vivo*-Versuchs in den implantierten Konstrukten nachgewiesen werden.

#### 3.10.4 Histologische Untersuchung 6 Wochen nach Implantation

Sechs Wochen nach der Implantation wurden beim Schneiden keine Rupturen des Gewebes im Bereich des Polyurethanschaumes mehr beobachtet. Nach 6 Wochen *in vivo* wiesen die Zellen eine knorpelähnliche Zellmorphologie auf. Auch die Intensität der durch Alzianblau und Safranin O blau bzw. rot gefärbten Extrazellulärmatrix der differenzierten Fettstammzellen nahm zu (Abb. 45, Abb. 46). Knorpelnahe Areale sowie das Innere der implantierten Konstrukte stimmten in der Farbintensität mit der von Knorpel überein. Ebenso wurde durch die Safranin O-Färbung eine Zunahme an Glykosaminoglykanen in der Extrazellulärmatrix der differenzierten Fettstammzellen bestätigt. Der Polyurethanschaum war an vielen Stellen des implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstruktes bereits resorbiert. In die entstehenden Hohlräume proliferierten und migrierten weiterhin die mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen und führten durch ihr kontinuierliches Wachstum zu einer fast durchgehenden Defektdeckung.

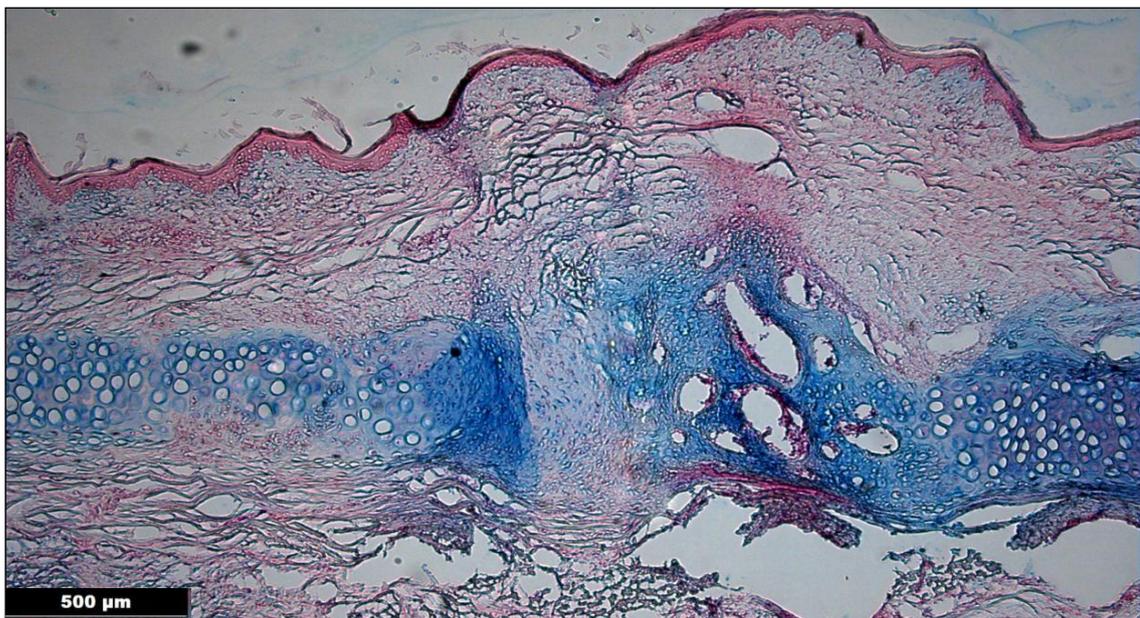


Abb. 45: Alzianblau-Färbung  
Chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 6-wöchiger Implantation  
in die Kaninchenohrmuschel  
Vergleichsmaßstab: 500  $\mu\text{m}$

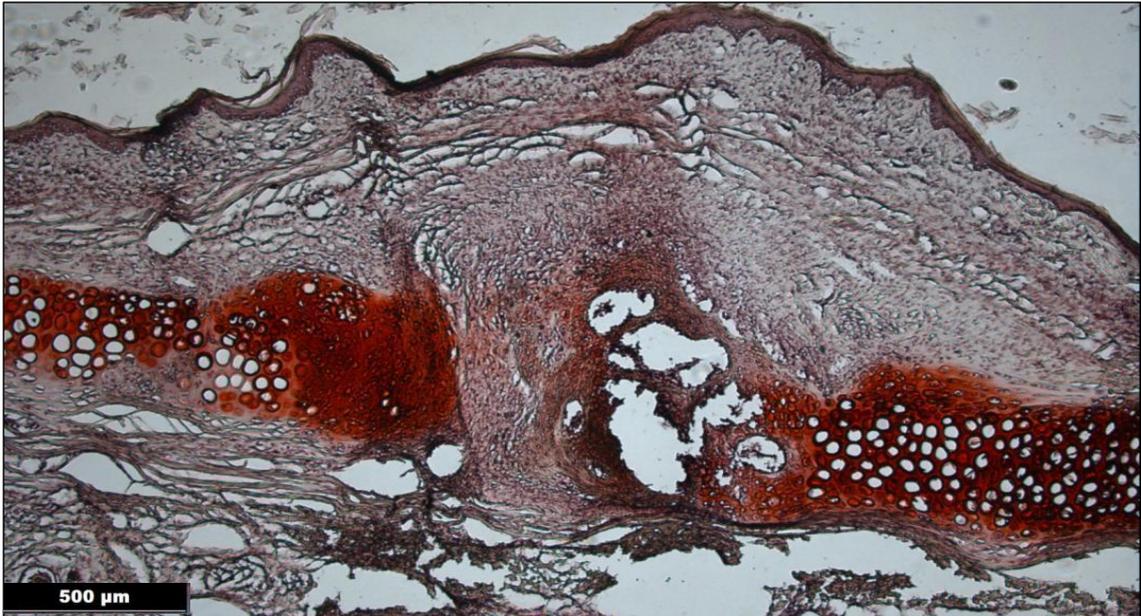


Abb. 46: Safranin O-Färbung  
Chondrogen differenziertes Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nach 6-wöchiger Implantation in die Kaninchenohrmuschel, Vergleichsmaßstab: 500 µm

In der Vergrößerung der Gewebeausschnitte war eine zunehmende Resorption des Polyurethanschaums zu erkennen. An den Auflösungsstellen des Polyurethanschaums vergrößerte sich die Anzahl der Zellen und die proliferierenden Fettstammzellen füllten die entstandenen Hohlräume auf (Abb. 47). Die knorpelähnliche Zellmorphologie der differenzierten Fettstammzellen war auch in der Vergrößerung der Alzianblau-Färbung zu erkennen (Abb. 47, A). Die rotgefärbten Zellkerne befanden sich in einer Gewebehöhle umgeben von blaugefärbter Extrazellulärmatrix.

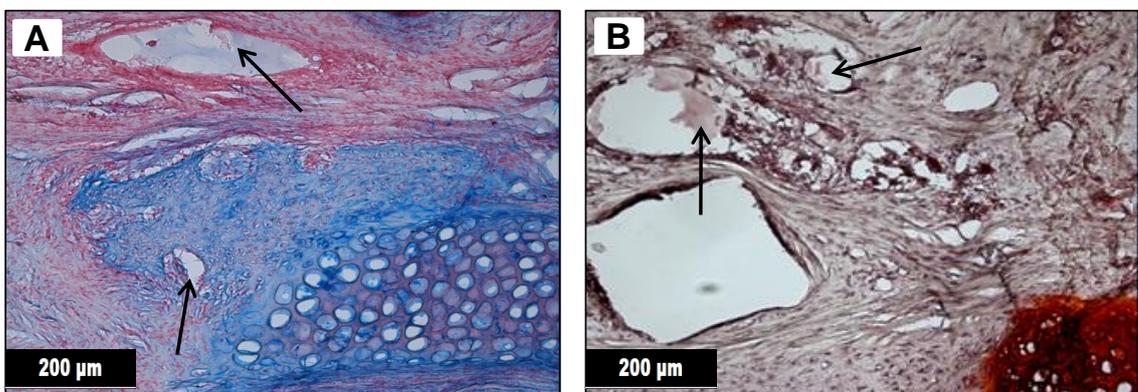


Abb. 47: Gewebeausschnitt des knorpelnahen Polyurethan-Fibrin-Konstrukts 6 Wochen nach Implantation. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Reste des Polyurethanschaums und die zunehmende Proliferation der differenzierten Fettstammzellen. Bild **A**: Alzianblau-Färbung, Bild **B**: Safranin O-Färbung, Vergleichsmaßstab: 200µm

### 3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit gelang es, aus Fettgewebe mesenchymale Stammzellen zu isolieren, die stammzellspezifische Oberflächenmoleküle exprimierten und erfolgreich in Fettzellen, Knochenzellen und Knorpelzellen differenziert wurden. Mesenchymale Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten wurden durch Zugabe unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen innerhalb von 21 Tagen zu Matrix produzierenden Knorpelzellen differenziert. Sowohl biochemisch als auch histologisch wurden in der extrazellulären Matrix der chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen für hyalinen Knorpel spezifische Kollagene und Glykosaminoglykane nachgewiesen. Die Expression knorpelspezifischer Marker-Gene konnte molekularbiologisch bestätigt werden. Durch erhöhte Wachstumsfaktorkonzentrationen und den Einfluss der Wachstumsfaktorkombinationen 1B2B+T und I+T erzielten die chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen nach 21 Tagen den höchsten Anstieg der Expression knorpelspezifischer Marker-Gene, wie Kollagen 2 und Aggrecan, in Übereinstimmung mit dem biochemisch ermittelten Kollagen- und Glykosaminoglykan-Gehalt. Die Analyse der histologischen Färbungen ergab, dass die mesenchymalen Fettstammzellen nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung eine knorpeltypische Zellmorphologie angenommen hatten und eine glykosaminoglykanreiche extrazelluläre Matrix produzierten. Nach der erfolgreichen chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen *in vitro* wurden mit mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte chondrogen *in vitro* vordifferenziert und *in vivo* implantiert. Die in Knorpelläsionen der Kaninchenohrmuschel implantierten chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden 3 bzw. 6 Wochen nach der Implantation sowohl zur makroskopischen als auch zur histologischen Untersuchung entnommen. Weder makroskopisch noch histologisch konnten Entzündungszeichen und Abstoßungsreaktionen der implantierten Konstrukte beobachtet werden. Die Analyse der histologischen Färbungen ergab eine weiterhin zunehmende chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Fettstammzellen nach Implantation *in vivo*. 6 Wochen nach Implantation war das Polyurethan-Fibrin-Trägermaterial fast vollständig resorbiert und die Knorpelläsion durch proliferierende chondrogen differenzierte mesenchymale Fettstammzellen und deren Matrix ausgefüllt.

## 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein körpereigenes, zellbasiertes Implantat für die Behandlung von Stimmlippenlähmungen zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Knorpelersatzgewebe aus humanen mesenchymalen Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt hergestellt. Untersucht wurde der Einfluss unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen auf die Knorpeldifferenzierung der aus Fettgewebe isolierten Stammzellen. Das Knorpelersatzgewebe wurde molekularbiologischen, biochemischen und histologischen Analysen unterzogen, um herauszufinden, durch welche Wachstumsfaktorkombination die mesenchymalen Fettstammzellen bestmöglich zu Matrix produzierenden Knorpelzellen heranreifen. Nach erfolgreicher chondrogener Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten *in vitro* erfolgte die Implantation körpereigener Konstrukte *in vivo* in die Ohrmuschel von Kaninchen zur Beurteilung der Integration der Konstrukte in einem Knorpeldefekt. Die implantierten Konstrukte wurden sowohl nach 3 als auch nach 6 Wochen zur makroskopischen und histologischen Analyse entnommen.

### 4.1 Einfluss von Zellkultur und Trägermaterial auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Fettstammzellen

#### 4.1.1 Charakteristika mesenchymaler Fettstammzellen

Fettgewebe ist eine spezielle Form des Bindegewebes des menschlichen Körpers. Das gut durchblutete Fettgewebe besteht aus Fettvorläuferzellen, sog. Präadipozyten und reifen Fettzellen, sog. Adipozyten. Durch den enzymatischen Verdau mit Collagenase P kann aus Liposuktionsmaterial und aus Fettschürzen ein Gemisch aus stromalen Zellen gewonnen werden (Rodbell et al., 1966). Das isolierte Zellgemisch beinhaltet nicht nur mesenchymale Präadipozyten, sondern auch Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen (Witowska-Zimny et al., 2011). Dieses stromale Zellgemisch wird auch stromale vaskuläre Zellfraktion (SVF) genannt oder unter dem Begriff mesenchymale Fettstammzellen, sog. adipose-derived stem cells (ASCs), zu-

sammengefasst. Aus 200 ml Liposuktionsmaterial oder zerkleinertem Fettgewebe lassen sich  $10^6$  mesenchymale Fettstammzellen isolieren (Zhu et al., 2008). Bedeutsam für die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen sind die chirurgische Entnahme des Fettgewebes, dessen Entnahmestelle beim Patienten und das Alter des Spenders. Aus Liposuktionsmaterial isolierte mesenchymale Fettstammzellen weisen eine geringere Proliferation auf als die aus Fettschürzen isolierten mesenchymalen Fettstammzellen (Oedayrajsingh-Varma et al., 2006). Aus weißem Fett, wie subkutanem Bauchfettgewebe, isolierte mesenchymale Fettstammzellen zeigen ein rascheres Wachstum und ein gesteigertes Differenzierungspotential als mesenchymale Fettstammzellen, die anderen Körperregionen entnommen werden (Jurgens et al., 2008, Prunet-Marcassus et al., 2006). Dieses erhöhte Differenzierungspotential konnte vermehrt bei jüngeren Patienten beobachtet werden (Schipper et al., 2008). Aus diesen Gründen wurden für die vorliegende Arbeit mesenchymale Fettstammzellen nur aus Fettschürzen der Bauchregion isoliert. Das verwendete Fettgewebe stammte von vier gesunden, etwa gleichaltrigen weiblichen Patientinnen, die sich noch nicht in der Menopause befanden.

Bereits in den 1980-er und 1990-er Jahren erkannten Wissenschaftler, dass mesenchymale Stammzellen multipotent sind und sich in verschiedene mesenchymale Zelltypen, wie Fettzellen, Knochenzellen und Knorpelzellen differenzieren lassen (Hauner et al., 1987, Pittenger et al., 1999). Zudem wurden in der Literatur die für Stammzellen aus dem Knochenmark, auch bone marrow-derived stem cells (BMSCs) genannt, typischen Oberflächenmoleküle ausführlich charakterisiert. Zu den immunophänotypischen Oberflächenmolekülen mesenchymaler Stammzellen gehören beispielsweise CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105. Die hämatopoetischen Oberflächenmoleküle CD34, CD45 sind negativ (Deans et al., 2000, Dominici et al., 2006). Die plastikadhärenten mesenchymalen Fettstammzellen lassen sich ebenfalls in verschiedene Zelltypen differenzieren und besitzen stammzellspezifische Oberflächenmoleküle (Locke et al., 2011). Die Differenzierungseigenschaften und Oberflächenmoleküle der mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe wurden bereits verglichen (De Ugarte et al., 2003). Mitchell und Mitarbeiter stellten bei der Untersuchung mesenchymaler Fettstammzellen auf verschiedene Oberflächenmoleküle fest, dass niedrige Passagen der Fettstammzellen positiv für hä-

matopoetische Oberflächenmoleküle wie CD34 sind. Durch Expansion *in vitro* verlieren die Fettstammzellen diesen Immunphänotyp und exprimieren vermehrt spezifische Oberflächenmoleküle wie CD73, CD90 und CD105 (Mitchell et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mesenchymalen Fettstammzellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf stammzellspezifische und hämatopoetische Oberflächenmoleküle untersucht. Sie waren positiv für stammzellspezifische Oberflächenmoleküle CD44, CD73, CD90, CD105 und negativ für hämatopoetische Oberflächenmoleküle CD31, CD34 und CD45. Zudem wurde ihr Differenzierungspotential in Fettzellen, Knochenzellen und Knorpelzellen durch Oil Red O-, von Kossa-, Alizarinrot- und Alzianblau-Färbung histologisch analysiert. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten mesenchymalen Fettstammzellen erfüllten somit die Kriterien der mesenchymalen Stammzellen (Dominici et al., 2006).

#### **4.1.2 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen**

Unterscheiden sich mesenchymale Fettstammzellen und Stammzellen aus dem Knochenmark in ihren immunophänotypischen Oberflächenmerkmalen nicht wesentlich (Zhu et al., 2008), besitzen die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark jedoch ein höheres Knorpeldifferenzierungspotential als mesenchymale Fettstammzellen (Jakobsen et al., 2010). Trotz des geringeren Knorpeldifferenzierungspotentials der mesenchymalen Fettstammzellen sollte man nicht außer Acht lassen, dass mesenchymale Fettstammzellen in größeren Mengen aus Fettgewebe isoliert werden können als mesenchymale Knochenmarkstammzellen aus Knochenmarkbiopsien (Strem et al., 2005). Auch die oft elektiv durchgeführten operativen Eingriffe zur Entfernung von Fettgewebe zeigen im Vergleich zu einer Knochenmarkbiopsie eine geringere Hebedefektmorbidität (Bain, 2005). Um das Knorpeldifferenzierungspotential der mesenchymalen Fettstammzellen zu verbessern, wurde das chondrogene Differenzierungsmedium in der vorliegenden Arbeit durch Zusätze ergänzt, die von Hennig und Puetzer vorgeschlagen werden (Hennig et al., 2007, Puetzer et al., 2010). Dem verwendeten Knorpeldifferenzierungsmedium wurde 1%-iges ITS<sup>+</sup>1, bestehend aus Insulin, Transferrin und Selen zugesetzt. Die Kombination dieser drei Substanzen ermöglichte die kontinuierliche Aufrechterhaltung der Vitalität und der

Nährstoffversorgung der Zellen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Differenzierungsmedium musste zusätzlich mit 40 µg/ml Prolin angereichert werden, da diese Aminosäure hochkonzentriert in der Extrazellulärmatrix vorkommt. Für den Stoffwechsel der aeroben Zellen und zur Energiegewinnung wurden 100 µg/ml Pyruvat in das Medium gegeben. In Anlehnung an die Studien von Chepda und Johnstone wurden in der vorliegenden Arbeit 50 µg/ml Ascorbinsäure und 0,1 µM des Hormons Dexamethason dem verwendeten Knorpeldifferenzierungsmedium zugefügt. Der Zusatz von Ascorbinsäure fördert die knorpeltypische Kollagen-Synthese und auch das Hormon Dexamethason in Kombination mit dem Wachstumsfaktor TGF-β3 stimuliert die Knorpelbildung der mesenchymalen Stammzellen (Chepda et al., 2001, Johnstone et al., 1998). Mehrere Forschungsgruppen setzten sich nicht nur mit der Zusammensetzung der Knorpeldifferenzierungsmedien auseinander, sondern auch mit den unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und deren Konzentrationen (Hennig et al., 2007, Kim et al., 2008, Puetzer et al., 2010). Da in unserer Arbeitsgruppe bereits die Analyse der Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten mit den Wachstumsfaktoren TGF-β1, TGF-β3 und BMP-2 erfolgte (Froelich et al., 2012), wurden in der vorliegenden Arbeit zur Verbesserung der chondrogenen Differenzierung neue Wachstumsfaktorkombinationen verwendet. Die vielversprechende Kombination der Wachstumsfaktoren TGF-β3 und BMP-6 lieferte sehr gute Ergebnisse in der Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Stammzellen und in der Expression des TGF-β1-Rezeptors durch BMP-6 (Estes et al., 2006, Hennig et al., 2007). Sekiya und Mitarbeiter zeigten, dass das Knorpeldifferenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen in einem mit Dexamethason und TGF-β3 angereicherten Differenzierungsmedium durch die Zugabe von BMP-6 gesteigert werden konnte (Sekiya et al., 2001). Zudem stellten Kim und Mitarbeiter fest, dass erhöhte Wachstumsfaktorkonzentrationen das Knorpeldifferenzierungspotential von mesenchymalen Fettstammzellen verbessert (Kim et al., 2008). Um solche zu Matrix produzierenden Knorpelzellen zu differenzieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktorkombinationen erhöhter Konzentration untersucht. Die erste Gruppe der mit mesenchymalen Fettstammzellen besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte erhielt TGF-β3 50 ng/ml in Kombination mit BMP-6 500 ng/ml. Eine spätere Zugabe des BMP-6 zu TGF-β3 verringerte

bei der Knorpeldifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen die knorpel-spezifischen Bestandteile der extrazellulären Matrix (Indrawattana et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Variante der chondrogenen Vordifferenzierung eingesetzt. Mesenchymale Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten wurden in der zweiten Gruppe eine Woche nur mit BMP-6 500 ng/ml chondrogen vordifferenziert und anschließend mit TGF- $\beta$ 3 50 ng/ml und BMP-6 500 ng/ml weiterdifferenziert. Indrawattana und Mitarbeiter untersuchten nicht nur die Auswirkung der Kombination von TGF- $\beta$ 3 und BMP-6 auf die Knorpeldifferenzierung, sondern auch die Kombination aus TGF- $\beta$ 3 und IGF-I (Indrawattana et al., 2004). IGF-I hat ebenfalls eine positive Auswirkung auf das Knorpeldifferenzierungspotential von mesenchymalen Fettstammzellen, da IGF-I eine hemmende Wirkung auf extrazelluläre Matrix abbauende Metalloproteinasen ausübt (An et al., 2010). Zudem fördert IGF-I das Zellwachstum und den Zellstoffwechsel (Indrawattana et al., 2004). Aus diesen Gründen wurden die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in der vorliegenden Arbeit in der dritten Gruppe mit der Wachstumsfaktorkombination TGF- $\beta$ 3 50 ng/ml und IGF-I 100 ng/ml chondrogen differenziert.

#### **4.1.3 Polyurethan-Fibrin-Konstrukt als Trägermaterial für Tissue Engineering**

Die dreidimensionale Anordnung der mesenchymalen Fettstammzellen in einem hochdichten Zellkugelchen oder in einem Trägermaterial fördert ebenfalls die chondrogene Differenzierung. Das Trägermaterial entspricht einer künstlichen Extrazellulärmatrix und dient den Zellen als Vorlage für die Bildung neuen Gewebes. Deshalb sollte das verwendete Trägermaterial bioverträglich sein, damit die Zellen sich an der Oberfläche anheften, sich vermehren und neue Extrazellulärmatrix produzieren können. Ziel der Entwicklung eines Ersatzgewebes ist es, dass sich das Trägermaterial nach einiger Zeit abbaut und die Zellen mit ihrer neugebildeten extrazellulären Matrix dessen Platz einnehmen. Das Trägermaterial sollte zusammenhängende, offene Poren aufweisen, die es ermöglichen, die Zellen mit Nährstoffen zu versorgen und Stoffwechselprodukte an die freie Oberfläche abzutransportieren. Der Porendurchmesser sollte groß genug sein, damit die Zellen auch ins Innere des Trägermaterials wachsen können (O'Brian, 2011). Aufgrund seiner interkonnektiven Poren, seiner völlig

offenen und hydrophilen Oberflächenstruktur kam in dieser Arbeit ein Polyurethanschaum als Trägermaterial für die Entwicklung von Knorpelersatzgewebe aus mesenchymalen Fettstammzellen zur Anwendung. Dieser Polyurethanschaum zeichnet sich dadurch aus, dass viele Parameter bei der Herstellung variiert werden können. Der stabile Polyurethanschaum kann durch den digitalen, dreidimensionalen schnellen Prototypenbau, Rapid-Prototyping genannt, in unterschiedlichen Formen und Größen, wie z.B. in Ohrmuschelform, produziert werden (Chetty et al., 2008, Staudenmaier et al., 2010). Nicht nur die dem Defekt angepasste Form und Größe, sondern auch die Porengröße, die Porendichte, die hydrophilen Oberflächeneigenschaften und die Bioabbaubarkeit lassen sich bei der Polyurethan-Herstellung verändern. Der von polyMaterials (Kaufbeuren) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Polyurethanschaum ist derzeit noch nicht von der Lebensmittelüberwachungs- und der Arzneimittelzulassungsbehörde zugelassen und noch nicht klinisch getestet. Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe untersuchten die Auswirkung der in den Polyurethanschäumen der Firma polyMaterials enthaltenen Konzentrationen von Dextrose, Poly(ethylenglykol)-Poly(propylenglykol)-Poly(ethylenglykol) und Triethanolamine auf humane Knorpelzellen und Lymphozyten. Bei einer Dextrosekonzentration von 4,25 mg/ml, einer Poly(ethylenglykol)-Poly(propylenglykol)-Poly(ethylenglykol)-Konzentration von 0,15 mg/ml und einer Triethanolaminkonzentration von 0,9 mg/ml konnten genotoxische und zytotoxische Effekte auf die Zellen ausgeschlossen werden (Havla et al., 2010, Lotz et al., 2009).

Lee und Mitarbeiter verglichen die Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrix von Knorpelzellen in einer reinen Polyurethan-Matrix mit der in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt. In dem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt produzierten die Knorpelzellen mehr Kollagen 2 und Glykosaminoglykane (Lee et al., 2005). Die dicht aneinander liegenden Poren erschweren die Adhärenz der Zellen und deren Extrazellulärmatrix (Grad et al., 2003). Bei besonders großen offenen Poren gleiten die Zellen samt Extrazellulärmatrix aus dem Polyurethanschaum heraus und lagern sich am Boden der Zellkulturschale an. Deswegen kombinierte unsere Arbeitsgruppe den formstabilen Polyurethanschaum mit einem langzeitstabilen Fibrin-Hydrogel. Um eine Schrumpfung und einen Zerfall des Fibrin-Hydrogels innerhalb des Polyurethanschaums zu verhindern, wurde in der vorliegenden Arbeit ein von Eylich und Mitarbeitern untersuchtes, langzeit-

stabiles Fibrin-Hydrogel verwendet (Eyrich et al., 2007a). Während der dreiwöchigen chondrogenen Differenzierung blieben die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in allen untersuchten Differenzierungsmedien formstabil und nahmen an Festigkeit zu. Eine Schrumpfung des Fibrin-Hydrogels konnte in diesem Zeitraum nicht beobachtet werden. Form- und Volumenstabilität sowie mechanische Festigkeit der chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte sind Voraussetzung für eine spätere klinische Anwendung. Diese Eigenschaften gewährleisten eine vollständige Defektdeckung durch das Knorpelersatzgewebe.

## **4.2 Qualität des Knorpelersatzgewebes**

### **4.2.1 Genexpression knorpelspezifischer Marker in der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion**

Unerlässlich für die Induktion der Genexpression von Kollagen 2, Kollagen 9 und Aggrekan ist der Transkriptionsfaktor SOX-9 (Akiyama et al., 2002, Lefebvre et al., 1998). Ausschlaggebend für die Genexpression von SOX-9 ist der Zusatz der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren im Knorpeldifferenzierungsmedium. Attisano und Wrana wiesen nach, dass der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 3 über einen "similar-mothers against decapentaplegic", sog. SMAD-Komplex, in den Zellkern gelangt, sich an die DNA bindet und dort die Genexpression von SOX-9 aktiviert (Attisano et al., 2002). Zudem zeigten Studien von Sekiya und Song, dass die Zugabe des künstlichen Glukokortikoids Dexamethason und des Wachstumsfaktors BMP-6 in das Differenzierungsmedium die Genexpression von SOX-9 fördert (Sekiya et al., 2005, Song et al., 2012). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Genexpression des Transkriptionsfaktor SOX-9, ausgehend von Tag 0, bei allen eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen beobachtet. Eine statistisch signifikante Steigerung der SOX-9 Genexpression wurde bei der Wachstumsfaktorkombination TGF- $\beta$ 3 und BMP-6 am Tag 21 gemessen. In gleicher Weise wie bei SOX-9 nahm in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von Kollagen 2, Kollagen 9 und Aggrekan der chondrogen differenzierten Fettstammzellen während des 21-tägigen Untersuchungszeitraums signifikant zu. Der Nachweis des Transkriptionsfaktors SOX-9 in den chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen bestätigte die Annahme, dass die Zugabe von

Wachstumsfaktoren in höheren Konzentrationen das Knorpeldifferenzierungspotential der Fettstammzellen steigert.

Die Expression von Kollagen 2, dem wichtigsten Bestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen, ist kennzeichnend für die erfolgreiche Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Fettstammzellen. Die ausschließliche Verwendung der Wachstumsfaktoren BMP-6 und IGF-I kann keine Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Stammzellen induzieren (Indrawattana et al., 2004). Erst die Kombination dieser zwei Wachstumsfaktoren mit TGF- $\beta$ 3 regt die Synthese von Kollagen 2 in der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen an (An et al., 2010, Puetzer et al., 2010). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit auch für die chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten bestätigt werden. So wurde nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung mit der Wachstumsfaktorkombination TGF- $\beta$ 3 und BMP-6 die höchste Genexpression von Kollagen 2 gegenüber den anderen Wachstumsfaktorkombinationen gemessen. Ein statistisch signifikantes Maximum der Kollagen 2-Genexpression erzielte am Tag 21 die Wachstumsfaktorkombination TGF- $\beta$ 3 und IGF-I.

Das fibrillenassoziierte Kollagen 9 ist kovalent mit Kollagen 2 und Proteoglykanen der extrazellulären Knorpelmatrix verbunden. Ohne Kollagen 9 kann die Integrität des Kollagennetzes der Extrazellulärmatrix nicht aufrechterhalten werden und der Knorpel würde somit an Stabilität verlieren (Eyre, 2002). In der vorliegenden Arbeit nahm die Genexpression von Kollagen 9 im Vergleich zu Tag 0 bei allen eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen zu. Auch hier zeigte sich wieder eine positive Auswirkung der Kombination von Dexamethason, TGF- $\beta$ 3 und BMP-6. Am Tag 21 hatte sich die Genexpression von Kollagen 9 in der Gruppe, die mit BMP-6 chondrogen vordifferenziert wurde, signifikant erhöht.

Die Expression von Kollagen 10 ist kennzeichnend dafür, dass Knorpelzellen fertig differenziert sind und hypertrophieren. Sie neigen zur Mineralisierung, ermöglichen somit das Einwachsen von Blutgefäßen und sterben daraufhin ab (Eyre, 2002). Studien von Boskey, Ma und Sekiya ergaben, dass es durch die Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und BMP-6 zu einem Anstieg der

Genexpression von Kollagen 10 kommt (Boskey et al., 2002, Ma et al., 2003, Sekiya et al., 2001). Zudem belegt eine Studie von Mushtaq und Mitarbeitern die Eigenschaft von IGF-1, die Hypertrophie von Knorpelzellen zu fördern (Mushtaq et al., 2004). Auch eine längere Kultivierungsdauer erhöhte die Genexpression von Kollagen 10 (Ma et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der Genexpression von Kollagen 10 bei allen eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen ausgehend vom Tag 0. Ein statistisch signifikantes Maximum der Genexpression von Kollagen 10 erreichte die Wachstumsfaktorkombination aus TGF- $\beta$ 3 und IGF-I am Tag 21. Um die Auswirkung der eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen auf die Hypertrophie chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen noch gezielter zu untersuchen, sollte in Folgestudien unserer Arbeitsgruppe ein weiterer Nachweis eines Hypertrophie-Marker-Gens, wie der alkalischen Phosphatase, durchgeführt werden.

Außer den Kollagenen sind in der Extrazellulärmatrix des Knorpels Proteoglykane wie Aggrecan entscheidend für die hohe Kompressibilität und Festigkeit des Knorpels. Durch die Kombination des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 3 mit BMP-6 bzw. IGF-I wird auch vermehrt Aggrecan in der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen synthetisiert (An et al., 2010, Estes et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit erzielten am Tag 21 die eine Woche mit BMP-6 vordifferenzierten mesenchymalen Fettstammzellen in dem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt eine statistisch signifikante Zunahme der Genexpression von Aggrecan, ausgehend von Tag 0. Die in der vorliegenden Arbeit bei allen eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen ermittelte Genexpression von Aggrecan bestätigte, dass durch die Kombination von TGF- $\beta$ 3 mit BMP-6 oder IGF-1 die mesenchymalen Fettstammzellen zu Matrix produzierenden Knorpelzellen heranreifen.

Der Ausschluss von Faserknorpel ist entscheidend für die Beurteilung der Qualität des Knorpelersatzgewebes. Zusätzlich zu den knorpelspezifischen Marker-Genen wird die Genexpression des für Faserknorpel typischen Kollagen 1 untersucht. Kim und Mitarbeiter fanden bei der Untersuchung chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen heraus, dass durch die Erhöhung der Wachstumsfaktorkonzentrationen nicht nur eine Verbesserung der Expres-

sion knorpelspezifischer Marker-Gene erzielt wird, sondern auch eine Zunahme der Kollagen 1-Expression (Kim et al., 2008). Kollagen 1 wird aber nicht nur von chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen synthetisiert. Sowohl Barry und Mitarbeiter als auch Winter und Mitarbeiter stellten bei der Analyse der Genexpression von Kollagen 1 fest, dass mesenchymale Stammzellen die in serumhaltigen Expansionsmedium kultiviert wurden, dieses für Faserknorpel typische Marker-Gen exprimieren (Barry et al., 2001, Winter et al., 2003). Das in der Zellkultur verwendete wachstumsfördernde fötale Kälberserum beinhaltet Proteine, Kohlenhydrate, Hormone und Wachstumsfaktoren unbekannter Konzentration (Fitzsimmons et al., 2004). Diese einzelnen Inhaltsstoffe des fötalen Kälberserums regen die mesenchymalen Fettstammzellen bereits in der Monolayer-Kultur zu einer Kollagen 1-Synthese an. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls bereits am Tag 0 eine hohe Genexpression von Kollagen 1 gemessen. Die am Tag 0 in die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte eingebrachten mesenchymalen Fettstammzellen wurden zuvor in einem mit fötalem Kälberserum angereichertem Expansionsmedium kultiviert und vermehrt. Auch die Beobachtung in der vorliegenden Arbeit, dass die Kollagen 1-Genexpression der Kontrollgruppen im Expansionsmedium anstieg, bestätigt den Einfluss des fötalen Kälberserums auf die Kollagen 1-Genexpression. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Medien hinsichtlich der Genexpression von Kollagen 1 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

#### **4.2.2 Biochemische Analyse des DNA- und des Glykosaminoglykan- sowie Kollagen-Gehalts**

Fötales Kälberserum sowie weitere wachstumsfördernde Zusätze wie das oben genannte Insulin, Selen, Transferrin, Pyruvat und Prolin werden zur Zellkultivierung eingesetzt. Diese Zusätze ermöglichen die Versorgung der Zellen *in vitro* mit genügend Nährstoffen, um deren Proliferation aufrechtzuerhalten. Auch der Wachstumsfaktor IGF-I hat nicht nur eine positive Auswirkung auf die Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Stammzellen, sondern auch Einfluss auf die Proliferation und Vitalität der Zellen. Eine Studie von Messai und Mitarbeitern belegt anhand von Knorpelzellen von Ratten sowohl die durch IGF-I gesteigerte Aggrekan- und Kollagen 2-Synthese als auch eine vermehrte DNA-Synthese

der Knorpelzellen (Messai et al., 2000). Auch Kim und Mitarbeiter konnten bei einer vierwöchigen Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Fettstammzellen mit dem Wachstumsfaktor IGF-I eine kontinuierliche Zunahme des DNA-Gehalts beobachten (Kim et al., 2008). Nimmt die Vitalität der in einem dreidimensionalen Trägermaterial implantierten Zellen trotz wachstumsfördernder Zellkulturmedien ab, könnte eine mangelnde Nährstoff- und Sauerstoffversorgung im Trägermaterial ausschlaggebend sein. Lee und Mitarbeitern fiel bei der Untersuchung von mit Knorpelzellen besiedelten Polyurethan-Fibrin-Konstrukten eine Zellvermehrung in der Peripherie des Konstruktes auf, die die Versorgung der Knorpelzellen im Inneren des Konstruktes erschwerte (Lee et al., 2005). Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte DNA-Gehalt nahm innerhalb von 21 Tagen bei allen eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen ab. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte bei einem Vergleich der Wirkung der unterschiedlichen Medien auf den DNA-Gehalt nicht festgestellt werden. Der initiale Anstieg des DNA-Gehalts am Tag 14 in der Kontrollgruppe mit DMEM sowie bei der Wachstumsfaktorkombination IGF-I und TGF- $\beta$ 3 könnte auf die bereits genannten wachstumsfördernden Zusätze im Zellkulturmedium zurückzuführen sein. Möglicherweise führt eine unzureichende Nährstoffversorgung der inneren Bereiche des Polyurethan-Fibrin-Konstruktes ab Tag 21 zu einem Rückgang des DNA-Gehalts. Mittels histologischer Färbungen wurde analog zu Lee (2005) beobachtet, dass sich die mesenchymalen Fettstammzellen nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung in der Peripherie der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte ansammelten. Um diese Ergebnisse zu festigen, sollten zur Untersuchung der Apoptose der chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten in weiteren Arbeiten ein Nachweis von Caspase 3 oder ein Lebend-Tod-Test durchgeführt werden.

Die sulfatierten Glykosaminoglykane Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat in der Extrazellulärmatrix von chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen können biochemisch durch eine Färbereaktion mit 1,9-Dimethylmethylene-Blau nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe Diekman wies durch die 14-tägige Zugabe von 500 ng/ml BMP-6 vermehrt Glykosaminoglykane in der Extrazellulärmatrix von mesenchymalen Fettstammzellen in einem Alginate-Trägermaterial sowohl biochemisch, molekularbiologisch als auch histologisch nach (Diekman et al., 2010). Auch die Arbeitsgruppe Kim

erzielte durch die Anwendung der oben beschriebenen Nachweisverfahren übereinstimmende Ergebnisse in der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen mit den Wachstumsfaktor IGF-I in einem hochdichten dreidimensionalen Zellkugelchen. Durch die Zugabe von IGF-I wurde die Synthese von Glykosaminoglykanen im Vergleich zu Tag 0 um 30-50% gesteigert (Kim et al., 2008). Der Glykosaminoglykan-Gehalt stieg in der vorliegenden Arbeit bei allen eingesetzten Wachstumsfaktorkombinationen ausgehend vom Tag 0 an. Am Tag 21 vervierfachte sich der Glykosaminoglykan-Gehalt durch die Wachstumsfaktorkombination aus TGF- $\beta$ 3 und IGF-I gegenüber Tag 0. Durch die glykosaminoglykansensitiven histologischen Färbungen Safranin O und Alzianblau ließ sich dieses Ergebnis bestätigen. Die Fettstammzellen hatten durch die Wachstumsfaktorkombination aus TGF- $\beta$ 3 und IGF-I eine knorpelzell-ähnliche Zellmorphologie angenommen, deren extrazelluläre Matrix sich rötlich bzw. blau färbte. Zudem wurde ein statistisch signifikanter Anstieg des Glykosaminoglykan-Gehalts am Tag 21 im Vergleich zu Tag 14 bei der Wachstumsfaktorkombination festgestellt, die in der ersten Woche nur aus BMP-6 bestand und anschließend durch TGF- $\beta$ 3 ergänzt wurde. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bei dieser Wachstumsfaktorkombination festgestellten Genexpression von Aggrekan. Der nachgewiesene Glykosaminoglykan-Gehalt in hyalinem Nasenseptumknorpel konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt unter Einfluss der verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen erreicht werden.

Der Kollagen-Gehalt der extrazellulären Matrix der chondrogen differenzierten Fettstammzellen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Picro-Sirius Red analog zu der Publikation von Choi spektrometrisch bestimmt (Choi et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit stieg der Kollagen-Gehalt innerhalb der 21-tägigen chondrogenen Differenzierung im Vergleich zu Tag 0 an. Der für hyalinen Nasenseptumknorpel nachgewiesene Kollagen-Gehalt konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt erreicht werden. Den statistisch signifikant höchsten Kollagen-Gehalt erzielte am Tag 21 die Wachstumsfaktorkombination, die in der ersten Woche nur aus BMP-6 bestand und anschließend durch TGF- $\beta$ 3 ergänzt wurde. Mit dieser Wachstumsfaktorkombination konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Anstieg der Genexpression knorpelspezifischer Kollagene am Tag 21 im Vergleich zu Tag 0 erreicht wer-

den, jedoch in geringerem Maße als bei der Wachstumsfaktorkombination TGF- $\beta$ 3 und IGF-I. Eine Picro-Sirius Red-Färbung histologischer Gefrierschnitte chondrogen differenzierter Polyurethan-Fibrin-Konstrukte sollte in diesem Zusammenhang in weiterführenden Arbeiten eine Quantifizierung des Kollagen-Gehalts in der extrazellulären Matrix der chondrogen differenzierten mesenchymalen Fettstammzellen ergänzen.

#### **4.2.3 Histologische Untersuchung der extrazellulären Matrix des Knorpelersatzgewebes**

Unsere Arbeitsgruppe erkannte während der Aufarbeitung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte für die histologischen Untersuchungen, dass die Anfertigung von Gefrierschnitten zu Rissen im Polyurethanschaum und Zellmaterial führte. Insbesondere zeigten sich bei Gefrierschnitten des Gewebes der im Expansionsmedium kultivierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte deutliche Einrisse. Den Ergebnissen der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion, der biochemischen Analyse und der histologischen Färbungen ist zu entnehmen, dass die mesenchymalen Fettstammzellen durch die Kultivierung im Expansionsmedium kaum knorpelspezifische extrazelluläre Matrix produzieren. Die histologischen Färbungen Alzianblau und Safranin O zeigten keine positive blaue und rote Anfärbung der extrazellulären Matrix. Auch makroskopisch behielten die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte im Expansionsmedium bis Tag 21 ihr schwammartiges Aussehen bei. Dies ließ darauf schließen, dass die geringe extrazelluläre Matrixproduktion der Fettstammzellen das Polyurethan-Fibrin-Konstrukt nicht ausreichend verfestigte und erklärte somit die gehäuften Geweberupturen der Gefrierschnitte in den Kontrollgruppen. Die Gefrierschnitte der chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte zerrissen weniger häufig, jedoch stets in den inneren zentralen Bereichen der Konstrukte. Diese Beobachtung bestätigte ebenfalls die Annahme, dass die Peripherie stärker besiedelt war als das Innere der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte. Zudem zeigte die Rasterelektronenmikroskopie des Polyurethanschaums Bereiche mit kleineren Poren, die möglicherweise das weitere Vordringen des Fibrin-Hydrogels mit mesenchymalen Fettstammzellen in das Innere des Polyurethanschaums erschweren.

Über den histologischen Nachweis von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter Fettstammzellen durch Alzianblau und Safra-

in O-Färbung wurde bereits berichtet (Choi et al., 2012, Park et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit erfolgte analog zu Huang die Auswertung der Alzianblau- und Safranin O-Färbung rein visuell deskriptiv (Huang et al., 2004). Die Analyse der histologischen Färbungen in der vorliegenden Arbeit ergab, dass die mesenchymalen Fettstammzellen nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung eine knorpeltypische Zellmorphologie angenommen hatten und eine glykosaminoglykanreiche extrazelluläre Matrix produzierten.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit eine chromogene Immunhistochemie durchgeführt. Mit dieser Methode ließ sich ergänzend zu den Ergebnissen der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion die Expression von SOX-9, Kollagen 2 und Aggrekan im Gewebe der chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte überprüfen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion wurde SOX-9 sowohl in den Polyurethan-Fibrin-Konstrukten, die 21 Tage in Expansionsmedium kultiviert wurden, als auch bei den chondrogen differenzierten Konstrukten in den Zellkernen der mesenchymalen Fettstammzellen nachgewiesen. Nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung konnte in der extrazellulären Matrix der mesenchymalen Fettstammzellen eine zunehmende Kollagen 2- und Aggrekan-Synthese immunhistochemisch bestätigt werden. In weiterführenden Arbeiten wäre ein zusätzlicher immunhistochemischer Nachweis von Kollagen 1 und Kollagen 10 in der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter mesenchymaler Fettstammzellen analog zu Ho und Nöth sinnvoll (Ho et al., 2010, Nöth et al., 2007).

### **4.3 Polyurethan-Fibrin-Konstrukte im Tiermodell**

#### **4.3.1 Implantationsmodell am Kaninchen**

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass mesenchymale Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt durch Zugabe unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen erhöhter Konzentrationen innerhalb 21 Tagen *in vitro* zu Matrix produzierenden Knorpelzellen heranreifen. Unsere Arbeitsgruppe verfolgte als nächstes Ziel, die mit autologen mesenchymalen Fettstammzellen besiedelten und chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte *in vivo* zu implantieren, um deren Integration und Stabilität zu untersuchen.

Arbeitsgruppen haben mit Knorpelzellen besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte subkutan in Nacktmäuse implantiert. In diesen *in vivo*-Tiermodell-Studien wurde bestätigt, dass die Knorpelzellen *in vivo* weiterhin vermehrt extrazelluläre Matrix synthetisieren (Eyrich et al., 2007b, Haisch et al., 2002, Roter et al., 1998). Durch die subkutane Implantation dieser Knorpelersatzgewebe können aber Fragestellungen bezüglich Defektdeckung oder Eingliederung des Ersatzgewebes in Knorpel nicht ausreichend beantwortet werden. Entscheidend ist, dass diese Knorpelersatzgewebe dafür entwickelt werden, Knorpeldefekte ausreichend zu decken und sich mit dem gesunden Knorpelgewebe zu verbinden. Ten Koppel und Mitarbeiter entwickelten ein Tiermodell, das die Beurteilung dieser wichtigen Eigenschaften ermöglicht (ten Koppel et al., 2001). Im Gegensatz zu Gelenkknorpel kann der Ohrmuschelknorpel weißer Neuseeländer Kaninchen durch eine für das Tier weniger schmerzhaftes Prozedur leicht freigelegt werden. Mittels einer Biopsiestanze können aneinander gereihte Knorpeldefekte in der Ohrmuschel erzeugt werden. Dieses Verfahren ermöglicht das Implantieren unterschiedlicher Knorpelersatzgewebe. Zudem besitzen Kaninchen im Nacken ein Fettpolster, aus dem durch einen kleinen chirurgischen Eingriff mesenchymale Fettstammzellen isoliert werden können. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mesenchymale Fettstammzellen aus dem Nackenfettgewebe von Meerschweinchen isoliert und *in vitro* zu Knorpelzellen differenziert. Mesenchymale Meerschweinchen-Fettstammzellen, die aus Nackenfettgewebe isoliert wurden, zeigten in dieser Studie ein rascheres Zellwachstum als aus Bauchfettgewebe isolierte mesenchymale Meerschweinchen-Fettstammzellen (Froelich et al., 2011).

Ein weiterer Aspekt, der bei der Versuchsplanung der Implantation des Knorpelersatzgewebes *in vivo* berücksichtigt werden muss, ist die Vordifferenzierung der Zellen *in vitro*. Moretti und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkung einer *in vitro* stattfindenden Vordifferenzierung auf die sich anschließende Entwicklung von Knorpelgewebe *in vivo*. Für zwei Wochen *in vitro* chondrogen vordifferenzierte Zellen zeigten bei der *in vivo* Analyse des Knorpelersatzmaterials den höchsten Glykosaminoglykan-Gehalt (Moretti et al., 2005). Eine zweiwöchige chondrogene Vordifferenzierung ist ausreichend für die weitere Knorpeldifferenzierung *in vivo* (Eyrich et al., 2007b). Die Arbeitsgruppe Deponti fand zudem heraus, dass nach einer möglichst kurzen Vordifferenzierung *in vitro* und nach

einer anschließenden Implantation *in vivo* vermehrt knorpelspezifische extrazelluläre Matrix synthetisiert wird im Vergleich zu einer reinen *in vitro* Differenzierung (Deponti et al., 2012). Hennig und Mitarbeiter sind der Meinung, dass mesenchymale Fettstammzellen nach einer Inkubation mit BMP-6 vermehrt das TGF- $\beta$ 1-Rezeptor Protein exprimieren und dadurch verstärkt auf den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 3 reagieren. Des Weiteren empfiehlt Hennig, eine Wachstumsfaktorkombination aus BMP-6 und TGF- $\beta$ 3 für die Knorpeldifferenzierung von mesenchymalen Fettstammzellen anzuwenden (Hennig et al., 2007).

Diese Anregungen wurden in dem vorliegenden *in vivo*-Versuch im Kaninchenmodell aufgegriffen. Die aus Nackenfettgewebe isolierten autologen mesenchymalen Kaninchen-Stammzellen wurden mit der Wachstumsfaktorkombination, die in der ersten Woche nur aus BMP-6 500 ng/ml bestand und anschließend durch TGF- $\beta$ 3 50 ng/ml ergänzt wurde, in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt vor Implantation zwei Wochen chondrogen *in vitro* vordifferenziert.

#### 4.3.2 Einheilung und Defektdeckung

Mit autologen mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden für 3 und 6 Wochen in die Knorpelläsionen der Kaninchenohrmuscheln implantiert. Gefrierschnitte der entnommenen Konstrukte wurden zur Darstellung des Glykosaminoglykan-Gehalts mit Alzianblau und Safranin O gefärbt. In Anlehnung an das von O'Driscoll und Mitarbeitern entwickelte histologisch-morphologische Bewertungssystem von Knorpelersatzgewebe wurde die Integration und erzielte Defektdeckung der implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte beurteilt (O'Driscoll et al., 1986). Zudem wurde die extrazelluläre Matrix und die Zellmorphologie der differenzierten mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen analysiert. Eine durch das Polyurethan-Fibrin-Konstrukt verursachte Entzündungsreaktion konnte weder makroskopisch noch histologisch beobachtet werden. Die Analyse der Knorpelläsionen, aus denen sich die Polyurethan-Fibrin-Konstrukte vollständig herausgelöst hatten, zeigte trotz vitaler Knorpelenden keine Gewebeneubildung. Die positive Alzianblau- und Safranin O-Färbung der chondrogen vordifferenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte bestätigte die Annahme, dass die mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen eine glykosaminoglykanreiche Extrazellulärmatrix produzieren. Das Zerreißen der Gefrierschnitte nach 3-wöchiger Implantation *in vivo* er-

schwerte die Beurteilung der Integration des Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in den Ohrmuschelknorpel. Die implantierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte schlossen sich jedoch direkt an den Knorpel an. Eine sich aufbauende Verbindung zwischen den durch die Knorpelläsion zunächst getrennten Knorpelenden war in diesem Stadium bereits zu erkennen. Nach 6 Wochen war diese Verbindung jedoch deutlich fortgeschritten. Bis auf vereinzelte Areale wurde zu diesem Untersuchungszeitpunkt eine fast vollständige Defektdeckung und Integration der Konstrukte in den Defekt erzielt. Trotz einer Studie, die eine Resorption des Polyurethan-Trägermaterials innerhalb einer 6-monatigen Implantation *in vivo* ausschloss (Eyrich et al., 2007b), wurde in der vorliegenden Arbeit eine zunehmende Resorption des Polyurethanschaums nach 6-wöchiger Implantation festgestellt. Dies ließ sich aus dem deutlichen Rückgang der Leerraumdichte schließen. An den Auflösungsstellen des Polyurethanschaums nahm die Proliferation und Migration der differenzierten Fettstammzellen zu und noch vorhandene Leerräume wurden zunehmend durch diese Zellen und Gewebe aufgefüllt. Nach 6-wöchiger Implantation zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass mesenchymale Kaninchen-Fettstammzellen nach zweiwöchiger chondrogener Vordifferenzierung auch *in vivo* weiterhin knorpelspezifische extrazelluläre Matrix synthetisieren und die Differenzierung und Matrixbildung weiter fort schreitet. Um eine eindeutige Aussage über das Resorptionsverhalten des verwendeten Polyurethanschaums treffen zu können, sollte dieser *in vivo* Versuch über einen noch längeren Zeitraum durchgeführt werden. Auch eine histologisch-morphologische Analyse länger implantierter Konstrukte würde die Beurteilung der endgültigen Defektdeckung vervollständigen.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es möglich ist, mesenchymale Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt chondrogen zu differenzieren, um den hyalinen Knorpel in einem Knorpeldefekt zu ersetzen.

Unserer Arbeitsgruppe gelang der Nachweis, dass die aus Fettgewebe isolierten Zellen Stammzellpotential besitzen (Froelich et al., 2012). Diese mesenchymalen Fettstammzellen produzierten durch die Zugabe der Wachstumsfaktorkombination, die eine Woche aus BMP-6 500 ng/ml bestand und für die restliche Differenzierungsdauer mit TGF- $\beta$ 3 kombiniert wurde, sowie durch die

Wachstumsfaktorkombination aus TGF- $\beta$ 3 und IGF-I, nach 21 Tagen die knorpelähnlichste extrazelluläre Matrix. Dabei darf bei der Analyse dieser Knorpelersatzgewebe nicht unbeachtet bleiben, dass sich deren Genexpression chondrogener Marker und deren Zellmorphologie noch immer von hyalinem Knorpel unterscheiden. Entscheidend für die Entwicklung von Knorpelersatzgewebe sind nicht nur eine fördernde Wachstumsfaktorkombination und ein geeignetes dreidimensionales Trägermaterial, sondern auch der Einfluss der Mechanotransduktion auf das Gewebe. Elder und Mitarbeiter zeigten, dass die Knorpeldifferenzierung mesenchymaler Stammzellen durch mechanische Stimuli begünstigt wird (Elder et al., 2001). Eine bessere Nährstoffversorgung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte und eine verbesserte Knorpeldifferenzierung durch Mechanotransduktion des Gewebes könnten in Zukunft durch die Kultivierung in einem Bioreaktorsystem begünstigt werden (Carver et al., 2000, Lee et al., 2005). Ein vielversprechendes Trägermaterial stellt die Kombination aus stabilem Polyurethanschaum und einem langzeitstabilen Fibrin-Hydrogel dar. Für eine längere *in vitro* Expansion dieser Polyurethan-Fibrin-Konstrukte sollte das Medium mit Aprotinin angereichert werden, um zukünftig eine Schrumpfung und einen Abbau des Fibrin-Hydrogels weiterhin zu verhindern (Lee et al., 2005). Nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung wurde ein Rückgang des DNA-Gehalts gemessen, eine Nekrose aufgrund mangelnder Blutversorgung des *in vitro* entwickelten Knorpelersatzgewebes wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Knorpelgewebe ist zwar ein nicht vaskularisiertes Gewebe, dennoch wäre es von Vorteil, diese Konstrukte *in vivo* durch eine Lappenpräfabrikation an einem Gefäßstiel anzuschließen. Ein *in vivo* Versuch von Hoang und Mitarbeitern zeigte, dass mit Knorpelzellen besiedelte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte nach einer Implantation in einen präfabrizierten Lappen neovaskularisiert wurden und die Knorpelzellen vermehrt Glykosaminoglykane produzierten (Hoang et al., 2009). In Anlehnung an diese Erkenntnisse könnten die *in vivo* erfolgreich chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte zukünftig in den Kaninchen-Kehlkopf implantiert werden und mittels Lappenpräfabrikation durch kleine Blutgefäße der Halsregion neovaskularisiert werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Schädigung des Nervus laryngeus recurrens führt zu einer Lähmung der Kehlkopfmuskulatur und verursacht somit einen Stimmlippenstillstand. Die dadurch auftretenden Symptome wie Heiserkeit, Schluckbeschwerden und Atemnot können durch operative Eingriffe wie eine Thyroplastik und Stimmlippenaugmentation mit dem Ziel einer Medialisierung der gelähmten Stimmlippe behandelt werden. Immunologische Fremdkörperreaktion, Resorption oder Dislokation des eingebrachten Materials treten jedoch nicht selten als unerwünschte Folgen der Stimmlippenmedialisierung auf. Das Ziel, diese Nebenwirkungen zu verringern, führte zu der Überlegung, durch Tissue Engineering ein Knorpelersatzgewebe aus körpereigenen mesenchymalen Fettstammzellen zu züchten, das ohne immunologische Abwehrreaktion zur Therapie von Stimmlippenlähmungen eingesetzt werden kann. Unter diesem Aspekt wurden in der vorliegenden Arbeit mesenchymale Fettstammzellen aus Fettgewebe, sog. adipose-derived stem cells (ASCs), in einem stabilen und dennoch formbaren Polyurethan-Fibrin-Konstrukt unter Verwendung unterschiedlich kombinierter Wachstumsfaktoren chondrogen differenziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Wachstumsfaktorkombinationen zu finden, durch deren Wirkung die mesenchymalen Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt *in vitro* bestmöglich zu Matrix produzierenden Knorpelzellen heranreifen, um diese anschließend *in vivo* im Tiermodell zu implantieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Fettstammzellen aus humanem abdominalen Fettgewebe erwachsener weiblicher Spender ( $n = 4$ ) isoliert und *in vitro* expandiert. Die isolierten mesenchymalen Fettstammzellen wurden auf stammzellspezifische Oberflächenmoleküle mit der Durchflusszytometrie und histologisch auf ihr Multidifferenzierungspotential untersucht. Weitere isolierte mesenchymale Fettstammzellen wurden in Fibrinigel resuspendiert und in einen Polyurethanschaum eingebracht. Diese Polyurethan-Fibrin-Konstrukte wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen in einem chondrogenen Differenzierungsmedium unter der Zugabe der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 3 (50 ng/ml), BMP-6 (500 ng/ml) und IGF-I (100 ng/ml) kultiviert. Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung und der Bildung einer knorpelähnlichen extrazellulären Matrix erfolgte molekularbiologisch durch die Untersuchung der Polyurethan-

Fibrin-Konstrukte auf knorpelspezifische Marker-Gene mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und durch biochemische Analyse des DNA-, Glykosaminoglykan- und Kollagen-Gehalts. Zudem erfolgten histologische Färbungen mit Alzianblau und Safranin O sowie eine chromogene Immunhistochemie zur Darstellung der Extrazellulärmatrix und knorpelspezifischer Proteine wie SOX-9. Um die angestrebte Biokompatibilität, Einheilung und Defektdeckung dieser chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte zu untersuchen, erfolgte zusätzlich ein *in vivo*-Versuch an Kaninchen mit autologen mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen. Mesenchymale Kaninchen-Fettstammzellen wurden aus dem Nackenfett von New Zealand white rabbits (n = 6) isoliert und vermehrt. Nach einer 2-wöchigen chondrogenen Vordifferenzierung der mesenchymalen Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten durch Zugabe der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 3 (50 ng/ml) und BMP-6 (500 ng/ml) erfolgte die Implantation dieser Konstrukte in gestanzte, 4 mm große Knorpelläsionen der Kaninchenohrmuschel. Nach 3 und 6 Wochen wurden die chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte zur makroskopischen und histologischen Untersuchung durch Alzianblau- und Safranin O- Färbungen entnommen.

Die isolierten mesenchymalen Fettstammzellen waren negativ für hämatopoetische und positiv für stammzellspezifische Oberflächenmoleküle. Zudem wurden die mesenchymalen Fettstammzellen erfolgreich in Fettzellen, Knochenzellen und Knorpelzellen differenziert. Die RT-PCR Untersuchung der chondrogen differenzierten Polyurethan-Fibrin-Konstrukte zeigte einen Anstieg in der Genexpression knorpelspezifischer Marker-Gene wie Kollagen 2 (COL 2A1), Aggrecan (AGC 1) und des Transkriptionsfaktors SOX-9 ab Tag 14; auch der Kollagen- und Glykosaminoglykan-Gehalt erhöhten sich im Vergleich von 14 gegenüber 21 Tagen Inkubationszeit. Der histologische Nachweis saurer Glykosaminoglykane in der Extrazellulärmatrix durch Alzianblau-Färbung und der positive Nachweis von SOX-9, Kollagen 2 und Aggrecan durch die chromogene Immunhistochemie bestätigten die Annahme, dass mesenchymale Fettstammzellen in einem Polyurethan-Fibrin-Konstrukt unter Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Kombinationen zu Matrix produzierenden Knorpelzellen heranreifen können. Bei der Einheilung der Polyurethan-Fibrin-Konstrukte *in vivo* wurden weder Entzündungszeichen noch Abstoßungsreaktionen festgestellt.

Die histologischen Färbungen zeigten nach 6-wöchiger Implantation eine fortgeschrittene Chondrogenese der mesenchymalen Kaninchen-Fettstammzellen durch zunehmende, positive Anfärbung der Extrazellulärmatrix und einer knorpelähnlichen Zellmorphologie. Zeitgleich war die Polyurethan-Trägermatrix fast vollständig resorbiert, aber eine zunehmende Defektdeckung zu erkennen. Ein weitergehendes Ziel wird sein, *in vivo* erfolgreich chondrogen differenzierte Polyurethan-Fibrin-Konstrukte in den Kehlkopf eines Kaninchens zu implantieren.

## 6 ANHANG

### 6.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Geräte	Firma, Ort
Accu-jet® pro, Pipettierhilfe	Accu-jet®, Brand GmbH, Wertheim
Autoklav, Dampfsterilisation	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg
BD FACS Canto™ II flow cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator NU5500E	NuAire Inc., Plymouth, MA, USA
CASY INNOVATIS, Zellzählgerät	Innovatis AG, Reutlingen
CP 4056 Kühl-Gefrier-Kombination	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Würzburg
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Mini Spin Column, Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage	Kern, Albstadt
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar
Heizplatte, M6	CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen
HERAsafe, sterile Werkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Kryotom, Leica CM1510 S	Leica, Wetzlar
Membran-Vakuumpumpe	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz
Mikroskop, 473028	ZEISS, Oberkochen
pH-Meter	Wissenschaftlich-Technisch Werkstätten GmbH, Weilheim
Schüttelinkubator, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelinkubator, TH 25	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Step-One™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH, Darmstadt
Stickstofftank	Air liquide-DMC, Marne-la-Vallée, Frankreich
Titertek Multiskan® Plus Microplate Reader	Lab systems, Helsinki, Finnland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad (Julabo U37A)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
CASY-Cups (Zellcountergefäße)	Innovatis AG, Reutlingen
Chirurgische sterile Einmal-Skalpelle	FEATHER Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan
Cryomolds®, Tissue Tek® (10 mmx10 mmx10 mm)	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Biopsiestanze, Ø 4 mm, 5 mm	Harris Uni-Core™, Redding, CA, USA
Deckgläser (24x50 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einfrier Cryo Tube 2 ml	Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark
Eppendorf UVette®	Eppendorf AG, Hamburg
Falconröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Flow Cytometry Röhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht
Micro Amp 8 Cap strips	Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH, Darmstadt
Micro Amp Fastoptical 96-Well Plate	Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH, Darmstadt
Mr. Frosty, Einfrierbehälter	Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark
Pasteurpipetten, 230 mm	Brand GmbH, Wertheim
200µl, 1000µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
0,5-10µl Pipettenspitzen	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Objektträger, Super Frost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm®	Sigma-Parafilm®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
QIA RNeasy spin column	Qiagen GmbH, Hilden
QIA shredder spin column	Qiagen GmbH, Hilden
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürmbrecht
Steriler Filter, Filtropuor 0,45 µm	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturflaschen, 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur 4 Well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb 100 µm	Biosciences, Bedford, MA, USA

Chemikalien	Firma, Ort
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Alizarin Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aluminiumsulfat	Merck, Darmstadt
Alzianblau Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aprotinin	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleissheim
Blyscan Sulfated Glycosaminglycan Assay	Biocolor, Carrickfergus, Großbritannien
Buffer RLT, Lyse Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Buffer RW1, Wasch Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Buffer RPE, Wasch Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
CASY-Ton	Innovatis AG, Reutlingen
Cell-Wash	BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagenase P	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAse-freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,3' Diaminobenzidine (DAB) enhanced liquid system	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisessig, 100 %	Mallinckrodtbaker B.V., Deventer, Niederlande
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Fibrinogen, from bovine plasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kernechtrot	Merck, Darmstadt
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt

Nuclear Fast Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
O.C.T™ Tissue Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude Niederlande
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Papain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS, 10x	Roche Diagnostics, Mannheim
Rnalater®	Ambion, Austin, TX, USA
Sircol Collagen Assay	Biocolor, Carrickfergus, Großbritannien
Streptavidin Peroxidase Polymer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SuperScript R Vilo™ Mastermix	Invitrogen®, life technologies™ GmbH, Darmstadt
Taq Man Gene Expression Master Mix	Invitrogen®, life technologies™ GmbH, Darmstadt
Thrombin S	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleissheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin 0,25%-EDTA 1x	Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt

Nährmedium und Zusätze	Firma, Ort
β-Glycerol 2-phosphat disodium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BMP-6 human recombinant	PromoCell GmbH, Heidelberg
Dexamethasone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium 1	Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt
FCS (Fötale Kälberserum)	Linaris, Wertheim-Bettingen
IBMX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
IGF-I human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Indomethacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Insulin, human recombinant	PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
ITS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

L-Ascorbic acid-2-phosphate salt hydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Proline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin, (1000 U/1000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Sodium Pyruvate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TGF-β3 human recombinant	PromoCell GmbH, Heidelberg

Antikörper	Firma, Ort
Alexa Fluor®488, goat anti-mouse	Invitrogen, Salem, OR, USA
Biotin Anti-Mouse IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Biotin Anti-Rabbit IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mouse Anti-Aggregan	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Mouse Anti-Collagen Typ II	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Rabbit Anti-SOX-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Oberflächenmarker	Firma, Ort
APC Mouse Anti-human CD90	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
APC purified Anti-human CD105	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
FITC Mouse Anti-human CD44	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
FITC Mouse Anti-human CD45	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
PE Mouse Anti-human CD31	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
PE Mouse Anti-human CD34	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA
PE Mouse Anti-human CD73	BD, Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA

## 6.2 Messergebnisse und statistische Auswertung

### 6.2.1 Genexpression von SOX-9

Tabelle 11: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler der Genexpression von SOX-9 mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	<b>DMEM t0</b>	<b>1B2B+T t0</b>	<b>B+T t0</b>	<b>I+T t0</b>
Pat1	0,00600	0,00600	0,00600	0,00600
Pat2	0,00200	0,00200	0,00200	0,00200
Pat3	0,00300	0,00300	0,00300	0,00300
Pat4	0,00090	0,00090	0,00090	0,00090
<b>MW</b>	0,00298	0,00298	0,00298	0,00298
<b>SEM</b>	0,00110	0,00110	0,00110	0,00110

<b>B</b>	<b>DMEM t14</b>	<b>1B2B+T t14</b>	<b>B+T t14</b>	<b>I+T t14</b>
Pat1	0,00130	0,01000	0,01100	0,00660
Pat2	0,00080	0,00340	0,01500	0,01300
Pat3	0,01600	0,00270	0,00720	0,00470
Pat4	0,00600	0,00700	0,00700	0,00250
<b>MW</b>	0,00603	0,00578	0,01005	0,00670
<b>SEM</b>	0,00353	0,00169	0,00189	0,00226

<b>C</b>	<b>DMEM t21</b>	<b>1B2B+T t21</b>	<b>B+T t21</b>	<b>I+T t21</b>
Pat1	0,00790	0,00170	0,04500	0,00520
Pat2	0,00120	0,03400	0,07200	0,03100
Pat3	0,00100	0,00280	0,02800	0,00100
Pat4	0,07500	0,03700	0,01200	0,00340
<b>MW</b>	0,02128	0,01888	0,03925	0,01015
<b>SEM</b>	0,01798	0,00962	0,01283	0,00700

Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests der Genexpression von SOX-9. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
B+T t14 vs. t0	$\geq 0,1$	Nein
B+T t21 vs. t0	0.015	Ja
B+T t21 vs. DMEM t14	0,033	Ja
B+T t21 vs. 1B2B+T t14	0,031	Ja
B+T t21 vs. B+T t14	0,09	Nein
B+T t21 vs. I+T t14	0,04	Ja
B+T t21 vs. DMEM t21	$\geq 0,1$	Nein

## 6.2.2 Genexpression von Kollagen 2

Tabelle 13: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler der Genexpression von Kollagen 2 mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	0,000017	0,000017	0,000017	0,000017
Pat2	0,000013	0,000013	0,000013	0,000013
Pat3	0,000033	0,000033	0,000033	0,000033
Pat4	0,000012	0,000012	0,000012	0,000012
MW	0,000019	0,000019	0,000019	0,000019
SEM	0,000005	0,000005	0,000005	0,000005

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	0,000006	0,000170	0,001000	0,000012
Pat2	0,000010	0,000003	0,000120	0,000610
Pat3	0,000046	0,000011	0,000021	0,000020
Pat4	0,000012	0,000041	0,000006	0,000009
MW	0,000019	0,000056	0,000287	0,000163
SEM	0,000009	0,000039	0,000239	0,000149

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	0,000014	0,000200	0,003000	0,003000
Pat2	0,000009	0,000280	0,001600	0,021000
Pat3	0,000000	0,002000	0,006400	0,007000
Pat4	0,000029	0,000032	0,000220	0,000025
MW	0,000013	0,000628	0,002805	0,007756
SEM	0,000006	0,000460	0,001326	0,004640

Tabelle 14: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests der Genexpression von Kollagen 2. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
I+T t21 vs. t0	0,017	Ja
I+T t21 vs. DMEM t14	0,017	Ja
I+T t21 vs. 1B2B+T t14	0,018	Ja
I+T t21 vs. B+T t14	0,003	Ja
I+T t21 vs. I+T t14	0,002	Ja
I+T t21 vs. DMEM t21	0,018	Ja
I+T t21 vs. 1B2B+T t21	0,04	Ja

### 6.2.3 Genexpression von Kollagen 9

Tabelle 15: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler der Genexpression von Kollagen 9 mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	0,000070	0,000070	0,000070	0,000070
Pat2	0,000025	0,000025	0,000025	0,000025
Pat3	0,000065	0,000065	0,000065	0,000065
Pat4	0,000200	0,000200	0,000200	0,000200
MW	0,000090	0,000090	0,000090	0,000090
SEM	0,000038	0,000038	0,000038	0,000038

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	0,000100	0,000300	0,002400	0,000240
Pat2	0,000019	0,000830	0,000620	0,001200
Pat3	0,000090	0,001400	0,001400	0,000950
Pat4	0,000200	0,001500	0,002300	0,001400
MW	0,000102	0,001008	0,001680	0,000948
SEM	0,000037	0,000278	0,000419	0,000253

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	0,000350	0,001000	0,008300	0,002400
Pat2	0,000300	0,013000	0,001800	0,001200
Pat3	0,000016	0,001400	0,000500	0,000930
Pat4	0,006600	0,010000	0,000670	0,001100
MW	0,001817	0,006350	0,002818	0,001408
SEM	0,001596	0,003037	0,001850	0,000335

Tabelle 16: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests der Genexpression von Kollagen 9. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
1B2B+T t21 vs. t0	0,004	Ja
1B2B+T t21 vs. DMEM t1	0,004	Ja
1B2B+T t21 vs. 1B2B+T t14	0,02	Ja
1B2B+T t21 vs. B+T t14	0,07	Nein
1B2B+T t21 vs. I+T t14	0,02	Ja
1B2B+T t21 vs. DMEM t21	0,08	Nein
1B2B+T t21 vs. I+T t21	0,04	Ja

### 6.2.4 Genexpression von Kollagen 10

Tabelle 17: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler der Genexpression von Kollagen 10 mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	0,01700	0,01700	0,01700	0,01700
Pat2	0,00120	0,00120	0,00120	0,00120
Pat3	0,00300	0,00300	0,00300	0,00300
Pat4	0,00100	0,00100	0,00100	0,00100
MW	0,00555	0,00555	0,00555	0,00555
SEM	0,00384	0,00384	0,00384	0,00384

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	0,00058	0,17000	0,01400	0,21000
Pat2	0,00900	0,04000	0,73000	0,28000
Pat3	0,00400	0,01400	0,05300	0,02800
Pat4	0,00100	0,03000	0,02600	0,08000
MW	0,00365	0,06350	0,20575	0,14950
SEM	0,00194	0,03590	0,17494	0,05794

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	0,00120	0,14000	2,10000	2,30000
Pat2	0,00630	0,73000	0,63000	1,20000
Pat3	0,00035	0,06000	0,03700	0,53000
Pat4	0,02000	0,07000	0,02000	0,12000
MW	0,00696	0,25000	0,69675	1,03750
SEM	0,00454	0,16099	0,48878	0,47607

Tabelle 18: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests der Genexpression von Kollagen 10. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
I+T t21 vs. t0	0,01	Ja
I+T t21 vs. DMEM t14	0,01	Ja
I+T t21 vs. 1B2B+T t14	0,02	Ja
I+T t21 vs. B+T t14	0,08	Nein
I+T t21 vs. I+T t14	0,05	Ja
I+T t21 vs. DMEM t21	0,01	Ja
I+T t21 vs. B+T t21	$\geq 0,1$	Nein

### 6.2.5 Genexpression von Aggrekan

Tabelle 19: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler der Genexpression von Aggrekan mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	0,00030	0,00030	0,00030	0,00030
Pat2	0,00050	0,00050	0,00050	0,00050
Pat3	0,00090	0,00090	0,00090	0,00090
Pat4	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010
MW	0,00045	0,00045	0,00045	0,00045
SEM	0,00017	0,00017	0,00017	0,00017

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	0,00005	0,00240	0,00200	0,00009
Pat2	0,00005	0,00490	0,00250	0,00059
Pat3	0,00005	0,00100	0,02000	0,00016
Pat4	0,00043	0,00390	0,00800	0,00040
MW	0,00015	0,00305	0,00813	0,00031
SEM	0,00010	0,00085	0,00419	0,00012

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	0,00460	0,00430	0,00520	0,00023
Pat2	0,00009	0,03700	0,01300	0,00120
Pat3	0,00013	0,00450	0,00520	0,00150
Pat4	0,00050	0,07000	0,00300	0,00070
MW	0,00133	0,02895	0,00660	0,00091
SEM	0,00109	0,01569	0,00220	0,00028

Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests der Genexpression von Aggrekan. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
1B2B+T t21 vs. t0	0,009	Ja
1B2B+T t21 vs. DMEM t14	0,008	Ja
1B2B+T t21 vs. 1B2B+T t14	0,03	Ja
1B2B+T t21 vs. I+T t14	0,009	Ja
1B2B+T t21 vs. DMEM t21	0,01	Ja
1B2B+T t21 vs. B+T t21	$\geq 0,1$	Nein
1B2B+T t21 vs. I+T t21	0,01	Ja

### 6.2.6 Genexpression von Kollagen 1

Tabelle 21: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler der Genexpression von Kollagen 1 mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	206,0	206,0	206,0	206,0
Pat2	146,4	146,4	146,4	146,4
Pat3	26,2	26,2	26,2	26,2
Pat4	259,0	259,0	259,0	259,0
MW	159,4	159,4	159,4	159,4
SEM	50,0	50,0	50,0	50,0

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	0,3	25,2	8,4	121,7
Pat2	48,7	57,0	451,9	1001,5
Pat3	2,1	68,6	7,3	16,4
Pat4	20,8	214,0	104,0	134,7
MW	18,0	91,2	142,9	318,6
SEM	11,2	41,9	105,5	229,2

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	131,6	64,2	115,1	94,8
Pat2	50,1	171,7	536,5	668,0
Pat3	0,0	24,0	8,6	9,9
Pat4	122,8	377,2	110,1	211,5
MW	76,1	159,3	192,6	246,1
SEM	31,3	79,0	117,2	146,6

Tabelle 22: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests der Genexpression von Kollagen 1. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
B+T t14 vs. t0	$\geq 0,1$	Nein
I+T t14 vs. t0	$\geq 0,1$	Nein
B+T t14 vs. DMEM t14	$\geq 0,1$	Nein
I+T t14 vs. DMEM t14	$\geq 0,1$	Nein

### 6.2.7 Biochemische Analyse des DNA-Gehalts

Tabelle 23: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler des DNA-Gehalts in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Dargestellt sind die ermittelten Werte der 4 untersuchten Patienten und die verwendeten Differenzierungsmedien.

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	0,63	0,63	0,63	0,63
Pat2	1,20	1,20	1,20	1,20
Pat3	0,62	0,62	0,62	0,62
Pat4	0,60	0,60	0,60	0,60
<b>MW</b>	0,76	0,76	0,76	0,76
<b>SEM</b>	0,15	0,15	0,15	0,15

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	0,72	0,61	0,53	0,75
Pat2	0,90	1,50	0,60	0,90
Pat3	0,99	1,43	0,97	0,66
Pat4	1,30	0,69	0,58	1,93
<b>MW</b>	0,98	1,06	0,67	1,06
<b>SEM</b>	0,12	0,24	0,10	0,29

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	0,65	0,59	0,42	0,55
Pat2	0,52	0,30	0,54	0,52
Pat3	0,63	0,54	0,73	0,67
Pat4	0,92	0,69	0,50	0,63
<b>MW</b>	0,68	0,53	0,55	0,59
<b>SEM</b>	0,08	0,08	0,07	0,03

Tabelle 24: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests des biochemisch ermittelten DNA-Gehalts. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
1B2B+T t14 vs. t0	$\geq 0,1$	Nein
I+T t14 vs. t0	$\geq 0,1$	Nein
1B2B+T t14 vs. B+T t14	$\geq 0,1$	Nein
I+T t14 vs. B+T t14	$\geq 0,1$	Nein

### 6.2.8 Biochemische Analyse des Glykosaminoglykan-Gehalts

Tabelle 25: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler des Glykosaminoglykan-Gehalts in Bezug auf den DNA-Gehalt in  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ .

Glykosaminoglykan-Gehalt des hyalinen Nasenseptumknorpels  $90 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ .

Tabelle **A**: Tag 0. Tabelle **B**: Tag 14. Tabelle **C**: Tag 21.

<b>A</b>	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	7,20	7,20	7,20	7,20
Pat2	2,70	2,70	2,70	2,70
Pat3	2,30	2,30	2,30	2,30
Pat4	2,40	2,40	2,40	2,40
<b>MW</b>	3,65	3,65	3,65	3,65
<b>SEM</b>	1,19	1,19	1,19	1,19

<b>B</b>	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	1,30	8,10	7,50	4,50
Pat2	2,80	3,10	11,00	9,80
Pat3	2,10	5,00	7,00	9,60
Pat4	1,60	10,40	11,60	3,30
<b>MW</b>	1,95	6,65	9,28	6,80
<b>SEM</b>	0,33	1,62	1,18	1,69

<b>C</b>	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	3,30	2,30	9,70	12,60
Pat2	8,60	23,10	10,20	19,80
Pat3	2,90	10,00	7,30	14,50
Pat4	2,00	7,90	10,60	15,50
<b>MW</b>	4,20	10,83	9,45	15,60
<b>SEM</b>	1,49	4,40	0,74	1,52

Tabelle 26: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests des biochemisch ermittelten Glykosaminoglykan-Gehalts.

Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
I+T t21 vs. t0	0,001	Ja
1B2B+T t21 vs. DMEM t14	0,04	Ja
I+T t21 vs. DMEM t14	0,0002	Ja
I+T t21 vs. 1B2B+T t14	0,03	Ja
I+T t21 vs. B+T t14	$\geq 0,1$	Nein
I+T t21 vs. I+T t14	0,04	Ja
I+T t21 vs. DMEM t21	0,002	Ja

### 6.2.9 Biochemische Analyse des Kollagen-Gehalts

Tabelle 27: Messergebnisse, Mittelwerte und Standardfehler des Kollagen-Gehalts in Bezug auf den DNA-Gehalt in  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ .

Kollagen-Gehalt des hyalinen Nasenseptumknorpels  $33 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ .

Tabelle A: Tag 0. Tabelle B: Tag14. Tabelle C: Tag 21.

A	DMEM t0	1B2B+T t0	B+T t0	I+T t0
Pat1	8,00	8,00	8,00	8,00
Pat2	5,40	5,40	5,40	5,40
Pat3	10,70	10,70	10,70	10,70
Pat4	10,00	10,00	10,00	10,00
MW	8,53	8,53	8,53	8,53
SEM	1,19	1,19	1,19	1,19

B	DMEM t14	1B2B+T t14	B+T t14	I+T t14
Pat1	7,00	9,00	12,30	11,60
Pat2	6,30	4,90	14,60	6,40
Pat3	8,60	6,90	6,80	10,40
Pat4	3,80	10,20	12,80	3,30
MW	6,43	7,75	11,63	7,93
SEM	1,00	1,17	1,68	1,90

C	DMEM t21	1B2B+T t21	B+T t21	I+T t21
Pat1	7,50	10,90	14,20	8,90
Pat2	12,40	25,90	13,20	12,50
Pat3	9,90	14,70	11,40	12,50
Pat4	7,80	9,20	13,10	11,10
MW	9,40	15,18	12,98	11,25
SEM	1,13	3,76	0,58	0,85

Tabelle 28: Übersicht der Ergebnisse des Bonferroni-Tests des biochemisch ermittelten Kollagen-Gehalts.

Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05,  $n = 4$ .

Bonferroni-Test	p-Wert	Signifikanz
1B2B+T t21 vs. DMEM t14	0,005	Ja
1B2B+T t21 vs. t14	0,02	Ja
1B2B+T t21 vs. B+T t14	$\geq 0,1$	Nein
1B2B+T t21 vs. I+T t14	0,03	Ja
1B2B+T t21 vs. DMEM t21	0,1	Nein
1B2B+T t21 vs. B+T t21	$\geq 0,1$	Nein
1B2B+T t21 vs. I+T t21	$\geq 0,1$	Nein

### 6.3 Abürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>BMP-6</b>	Bone morphogenetic protein-6
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ca.</b>	circa
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COMP</b>	Cartilage oligomeric matrix protein
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FITC</b>	Fluoreszeinisothiocyanat
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunde

<b>IGF-I</b>	Insulin Growth Factor-I
<b>Konz.</b>	Konzentration
<b>l</b>	Liter
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>M</b>	Molar (mol/l)
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	millimolar
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Runden pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes
<b>TGF-β3</b>	Transforming Growth Factor-β3
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
<b>U</b>	Unit (Enzymeinheit)
<b>vs.</b>	versus

## 6.4 Literaturverzeichnis

- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Combrugghe B (2002) The transcription factor SOX-9 has essential roles in successive steps of the chondrocytes differentiation pathway and is required for expression of SOX-5 and SOX-6. *Genes Dev* 16: 2813-2828
- An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J (2010) IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng* 38: 1647-1654
- Attisano L, Wrana JL (2002) Signal transduction by the TGF- $\beta$  Superfamily. *Science* 296: 1646-1647
- Baijens L, Speyer R, Linssen M, Ceulen R, Manni JJ (2007) Rejection of injectable silicone "Bioplastique" used for vocal augmentation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264: 565-568
- Bain JB (2005) Bone marrow biopsy morbidity: review of 2003. *J Clin Pathol* 58: 406-408
- Barry F, Boynton E, Beishan L, Murphy JM (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation dependent gene expression of matrix components. *Exp cell Res* 268: 189-200
- Borges J, Lang EM, Stark GB (2003) Tissue Engineering und regenerative Medizin in der rekonstruktiven Chirurgie. Steinkopff Verlag: Darmstadt
- Bosch P, Musgrave DS, Lee JY (2000) Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18: 933-944
- Boskey AL, Paschalis EP, Binderman I, Dity SB (2002) BMP-6 accelerates both chondrogenesis and mineral maturation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures. *J Cell Biochem* 54: 509-519
- Brodkin KR, Garcia AJ, Levenston ME (2004) Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 25: 5929-5938
- Brünings W (1911) Über eine neue Behandlungsmethode der Rekurrenslähmung. *Verh Dtsch Laryngol* 18: 93-151
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C (2008) Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45: 115-120

Carver SE, Heath CA (2000) Influence of intermittent pressure, fluid flow and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes. *Biotechnol Bioeng* 65: 274-281

Cavo JW (1985) True vocal fold paralysis following intubation. *Laryngoscope* 95: 1352-1359.

Chepda T, Cadau M, Girin P, Frey J, Chamson A (2001) Monitoring of ascorbate at constant rate in cell culture: effect on cell growth in vitro. *Cell Dev Biol Anim* 37: 26-30

Chetty A, Steynberg T, Moolman S, Nilen R, Joubert A, Richter W (2008) Hydroxyapatite coated polyurethane for auricular cartilage replacement: an in vitro study. *J Biomed Mater Res* 84: 475-482

Chhetri DK, Berke GS (2011) Injection of cultured autologous fibroblasts for human vocal fold scars. *Laryngoscope* 121: 785-792

Chhetri DK, Head C, Revazova E, Hart S, Bhuta S, Berke GS (2004) Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 864-870

Choi JS, Kim BS, Kim JD, Choi YC, Lee HY, Cho YW (2012) In vitro cartilage Tissue Engineering using adipose-derived extracellular matrix scaffolds seeded with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 18: 80-92

Deans RJ, Moseley AB (2000) Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28: 875-884

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928-1942

Deponti D, Di Giancamillo A, Mangiavini L, Pozzi A, Frascini G, Sosio C, Domeneghini C, Peretti GM (2012) Fibrin-based model for cartilage regeneration: tissue maturation from in vitro to in vivo. *Tissue Eng* 18: 1109-1122

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk P, Zhu M, Dragoo J, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick M (2003) Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101-109

Dey P, Saphos CA, McDonnell J, Moore VL (1992) Studies on the quantification of proteoglycans by dimethylmethylene blue dye binding method. Specificity, quantification in synovial lavage fluid, and automation. *Connect Tissue Res* 28: 317-324

- Diekman OB, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F (2010) Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue Eng* 16: 523-533
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 8: 315-317
- Dralle H, Sekulla C, Lorenz K, Brauckhoff M, Machens A (2008) Intraoperative monitoring of the recurrent laryngeal nerve in thyroid surgery. *World J Surg* 32: 1358-1366
- Elder SH, Goldstein SA, Kimur JH, Soslowsky LJ, Spengler DM (2001) Chondrocyte differentiation is modulated by frequency and duration of cyclic compressive loading. *Ann Biomed Eng* 29: 476-482
- Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 763-769
- Estes BT, Wu AW, Guilak F (2006) Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthr Rheum* 54: 1222-1232
- Eyre D (2002) Review of collagen of articular cartilage. *Arthr Res* 4: 30-35
- Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel MM, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T (2007a) Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28: 55-65
- Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessmar J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T (2007b) In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Eng* 13: 2207-2218
- Farndale RW, Sayers C, Barrett A (1981) A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 9: 247-248
- Fitzsimmons JS, Sanyal A, Gonzalez C, Fukumoto T, Clemens VR, O'Driscoll SW, Reinholz GG (2004) Serum-free media for periosteal chondrogenesis in vitro. *J Orthop Res* 22: 716-725
- Friedenstein AJ, Shapiro-Piatetzky II, Petrakova KV (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16: 381-390

- Friedrich G (1998) External vocal cord medialization: surgical experiences and modifications. *Laryngorhinootol* 77: 7-17
- Friedrich G, Bigenzahn W, Zorowka P (2005) *Phoniatrie und Pädaudiologie; Einführung in die medizinischen, psychologischen und linguistischen Grundlagen von Stimme, Sprache und Gehör*. Bern: Hans Huber Verlag
- Friedrich T, Hänsch U, Eichfeld U, Steinert M, Staemmler A, Schönfelder M (2000) Die Recurrensparese als Intubationsschaden? *Chirurg* 71: 539-544
- Froelich K, Scherzed A, Technau A, Hagen R, Kleinsasser NH, Radeloff A (2011) Multipotent stromal cells for autologous cell therapy approaches in guinea pig model. *ORL* 73: 9-16
- Froelich K, Setiawan LE, Technau A, Ramos-Tirado M, Hackenberg S, Hagen R, Staudenmaier R, Kleinsasser NH (2012) Influence of different growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in polyurethane-fibrin composites. *Int J Artif Organs* 10: 1-14
- Gimble JM (2003) Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 3: 705-713
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1219-1260
- Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M (2003) The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitation. *Biomaterials* 24: 5163-5171
- Haisch KS, Groger A, Gebert C, Sittinger M (2002) A Tissue Engineering-model for the manufacture of auricularshaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 259: 316-321
- Halum SL, Postma GN, Koufman JA (2005) Endoscopic management of extruding medialization laryngoplasty implants. *Laryngoscope* 115: 1051-1054
- Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF (1987) Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 64: 832-835
- Havla JB, Lotz AS, Richter E, Hagen R, Staudenmaier R, Kleinsasser NH (2010) Cartilage tissue engineering for auricular reconstruction: in vitro evaluation of potential genotoxic and cytotoxic effects of scaffold materials. *Toxicol In Vitro* 24: 849-853

Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W (2007) Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF beta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol* 211: 682-691

Ho ST, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW (2010) The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 31: 38-47

Hoang NT, Hoehnke C, Hien PT, Mandlik V, Feucht A, Staudenmaier R (2009) Neovascularization and free microsurgical transfer of in vitro cartilage engineered constructs. *Microsurg* 29: 52-61

Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol Unserer Zeit* 37: 120-126

Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P (2004) Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 113: 585-594

Indrawattana N, Chen GP, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A (2004) Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 914-919

Isshiki N, Morita H, Okamura H, Hiramoto M (1974) Thyroplasty as a new phonosurgical technique. *Acta Otolaryngol* 78: 451-457

Jakobsen RB, Shandadfar A, Reinholt JE, Brinchmann FP (2010) Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone and adipose tissue. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18: 1407-1416

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238: 265-272

Junqueira LCU, Bignolas G, Brenantinti RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11: 447-455

Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Millgen FJ (2008) Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 332: 415-426

- Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Iguchi F, Kim TS, Kishimoto M, Omori K, Ito J (2005) Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold. *Ann Oto Rhinol Laryngol* 114: 907-912
- Kim HJ, Im GI (2008) Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary. *J Orthop Res* 27: 612-619
- King JM, Simpson CB (2007) Modern injection augmentation for glottic insufficiency. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15: 153-158
- Kitagawa Y, Korobi M, Toriyama K, Kamei Y, Torii S (2006) History of discovery of human adipose-derived cells and their clinical application. *Jpn J Plast Reconstr Surg* 49: 1097-1104
- Kiviranta I, Jurvefin J, Tammi M, Säämänen AM, Helminen HJ (1985) Microspectro-photometric quantification of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry* 82: 249-255
- Laccourreye O, Papon JF, Kania R, Crevier-Buchman L, Brasnu D, Hans S (2003a) Intracordal injection of autologous fat in patients with unilateral laryngeal nerve paralysis: long-term results from the patient's perspective. *Laryngoscope* 113: 541-545
- Laccourreye O, Hans S (2003b) Endolaryngeal extrusion of expanded polytetrafluoroethylene implant after medialization thyroplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112: 962-964
- Laursen RJ, Larsen KM, Molgaard J, Kolze V (1998) Unilateral vocal fold paralysis following endotracheal intubation. *Acta Anaesth Scand* 42: 131-132
- Lee BJ, Wang SG, Lee JS, Jung JS, Bae YC, Jeong HJ, Kim HW, Lorenz RR (2006) The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs* 184: 198-204
- Lee CR, Grad S, Gorna K, Gogolewski S, Alini M (2005) Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis. *Tissue Eng* 11: 1562-1573
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B (1998) SOX-9 is a potent activator of the chondrocytespecific enhancer of the proa1 (II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17: 2336-2346
- Lev R, Spicer SS (1964) Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* 12: 309

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402-408

Locke M, Feisst V, Dunbar R (2011) Concise Review: Human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 29: 404-411

Long JL, Zuk P, Berke GS, Chhetri DK (2010) Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal Tissue Engineering. *Laryngoscope* 120: 125-131

Lotz AS, Havla JB, Richter E, Froelich K, Staudenmaier R, Hagen R, Kleinsasser NH (2009) Cytotoxic and genotoxic effects of matrices for cartilage tissue engineering. *Toxicol Lett* 190: 128-133

Loughran S, Alves C, MacGregor FB (2002) Current aetiology of unilateral vocal fold paralysis in a teaching hospital in the west of Scotland. *J Laryngol Otol* 116: 907-910

Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH (2003) Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res* 64: 273-281

MacGregor FB, Roberts D, Howard DJ, Phelps PD (1994) Vocal fold palsy: a re-evaluation of investigations. *J Laryngol Otol* 108: 193-196

McCulloch TM, Andrews BT, Hoffman HT, Graham SM, Karnell MP, Minnick C (2002) Longterm follow-up of fat injection laryngoplasty for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope* 112: 1235-1238

Merati AL, Halum SL, Smith TL (2006) Diagnostic testing for vocal fold paralysis: survey of practice and evidence-based medicine review. *Laryngoscope* 116: 1539-1552

Messai H, Duchossay Y, Khatib AM, Panasyok A, Mitrovic DR (2000) Articular chondrocyte from aging rats respond poorly to insulin like growth factor-1: an altered signaling pathway. *Mech Aging Dev* 115: 21-37

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24: 376-385

Moretti M, Wendt D, Dickinson SC, Sims TJ, Hollander AP, Ketty DJ (2005) Effects of in vitro preculture on in vivo development of human engineered cartilage in an ectopic model. *Tissue Eng* 11: 1421-1428

- Mülhardt C (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg: Springer Spektrum
- Mulisch M, Welsch U (Hrsg) (2010) *Romeis-Mikroskopische Technik*. Heidelberg: Springer Spektrum
- Mushtaq T, Bijman P, Ahmed SF, Farquharson C (2004) Insulin-like growth factor-I augments chondrocyte hypertrophy and reverses glucocorticoid-mediated growth retardation in fetal mice metatarsal cultures. *Endocrinology* 145: 2478-2483
- Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI (1991) Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 9: 465-470
- Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schultze N, Jakob F, Eulert J (2007) Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 83: 626-635
- O'Brian FJ (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today* 14: 88-95
- O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1986) The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J Bone Jt Surg Am* 68: 1017-1035
- Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt PF, van Milligen FJ (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8: 166-177
- Ollivere B, Duce K, Rowlands G, Harrison P, O'Reilly BJ (2006) Swallowing dysfunction in patients with unilateral vocal fold paralysis: aetiology and outcomes. *J Laryngol Otol* 120: 38-41
- Pagedar NA, Listinky CM, Tucker HM (2009) An unusual presentation of Teflon granuloma: case report and discussion. *Ear Nose Throat J* 88: 746-747
- Park JS, Shim MS, Shim SH, Yang HN, Jeon SY, Woo DG, Lee DG, Yoon TK, Park KH (2011) Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue or in bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- $\beta$ 3. *Biomaterials* 32: 8139-8149
- Payr E (1915) Plastik am Schildknorpel zur Behebung der Folgen einseitiger Stimmlippenlähmung. *Dtsch Med Wschr* 43: 1265-1270

- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR (2006) Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik. Stuttgart: Thieme
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147
- Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Andre M, Penicaud L, Casteilla L (2006) From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site specific differences. *Exp Cell Res* 312: 727-736
- Puchtler H, Meloan SN, Waldrop FS (1988) Are picro-dye reactions for collagens quantitative? *Histochemistry* 88: 243-256
- Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG (2010) Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng* 16: 435-444
- Rasch B, Friese M, Hofmann WJ (2006) Quantitative Methoden 1. Einführung in die Statistik. Heidelberg: Springer
- Remacle M, Lawson G (2007) Results with collagen injection into the vocal folds for medialization. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15: 148-152
- Rodbell M, Jones AB (1966) Metabolism of isolated fat cells. The similar inhibitory action of phospholipase C (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem* 241: 140-142
- Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M (1998) Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymerscaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 42: 347-356
- Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnersberg AD, Rubin JP (2008) Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 60: 538-544
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schiegel J (2002) Dedifferentiation associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 62-70
- Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD (2005) Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 26: 359-371.

Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ (2001) BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 411-418

Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ (2005) Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320: 269-276

Sittel C, Echternach M, Federspil PA, Plinkert PK (2006) Polydimethylsiloxane particles for permanent injection laryngoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115: 103-109

Sittel C, Bosch N, Plinkert PK (2008) Operative Stimmrehabilitation bei einseitiger Lähmung des N. laryngeus inferior (recurrens). *Chirurg* 79: 1055-1064

Skalak R, Fox C (1988) Tissue engineering: Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988. UCLA symposia on molecular and cellular biology

Skodacek D, Arnold U, Storck K, Alvarez CP, Ratzinger S, Staudenmaier R (2012) Chondrocytes suspended in modified fibrin glue for vocal fold augmentation: an in vitro study in a porcine larynx model. *Head Neck* 34: 667-673

Song YW, Zhang T, Wang WB (2012) Glucocorticoid could influence extracellular matrix synthesis through Sox-9 via p38 MAPK pathway. *Rheumatol Int* 32: 3669-3673

Staudenmaier R, Hoang NT, Mandlik V, Schurr C, Burghartz M, Hauber K, Meier G, Kadegge G, Blunk T (2010) Customized Tissue Engineering for ear reconstruction. *Karger* 68: 120-131.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-141

Tateya I, Hirano S, Kishimoto Y, Suehiro A, Kojima T, Ohno S, Ho J (2010) Impacts and limitations of medialization thyroplasty on swallowing function of patients with unilateral vocal fold paralysis. *Acta Oto Laryngol* 130: 84-87

ten Koppel PG, van Osch GJ, Verwoerd-Verhoef HL (2001) A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the 'rabbit pinna punch-hole' model. *Biomaterials* 22: 1407-1414

Volk GF, Hagen R, Pototschnig C, Friedrich G, Nawka T, Arens C, Mueller A, Foerster G, Finkensieper M, Lang-Roth R, Sittel C, Storck C, Groshera M, Kotby MN, Klingner CM, Guntinas-Lichius O (2012) Laryngeal electromyography: a proposal for guidelines of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269: 2227-2245

Wang Y, Blasioli D, Kim HJ, Kim HS, Kaplan D (2006) Cartilage tissue engineering with silk scaffold and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 27: 4434-4442

Wendler J, Seidner W, Eysholdt U (2005) *Lehrbuch der Phoniatrie und Pädaudiologie*. Stuttgart: Thieme

Wiese H, Maier G (2006) Open-pored polyurethane foam without skin formation, formulation for the production thereof and use thereof as a carrier material for cell and tissue cultures or medicaments, patent (WO 2006032501 A1). *PCT Int Appl* 37

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow derived and adipose tissue derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48: 418-429

Witowska-Zimny M, Walenko K (2011) Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett* 16: 236-257

Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *J Orthop Res* 27: 612-619

Zucker S, Buttle DJ, Nicklin MJ, Barrett AJ (1985) The proteolytic activities of chymopapain, papain, and papaya proteinase III. *Biochem Biophys* 828: 196-204

Zuk AP, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228

## 6.5 Kongressbeiträge und Publikationen

### Kongressbeiträge:

Symposium: Biomaterialien für das Tissue Engineering-Schwerpunkt Polyurethan, November 2012, Würzburg.

Tissue Engineering in der HNO

Autoren: K. Froelich, D. Weiss, N. H. Kleinsasser

Deutscher HNO Kongress 2013, Nürnberg.

Einfluss verschiedener Wachstumsfaktorkombinationen auf die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Fettstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten

Autoren: D. Weiss, K. Froelich, N. H. Kleinsasser, R. Hagen

### Publikation:

Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells (ASCs) in a polyurethane-fibrin scaffold using various growth factor combinations,  
in Vorbereitung für *Biomaterials*

## 6.6 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlichst:

- Bei Herrn Univ.-Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für das Ermöglichen dieser Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg.
- Bei Herrn Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA, meinem Doktorvater, für die interessante Themenvergabe und die engagierte wissenschaftliche Gesamtbetreuung.
- Bei Frau Oberärztin PD Dr. med. Katrin Frölich, meiner Betreuerin, für die fachkundliche, hilfreiche und liebenswürdige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tissue Engineering der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg, Petra Joa, Dipl.-Biol. Dr. Antje Technau, Dipl.-Ing. (FH) Mario Ramos-Tirado, Michael Kessler, Silke Hummel, Maragrete Appelman, Renate Port und Karin Jung.
- Bei den Operateuren und ihren Teams der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen) und Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Meffert) der Universität Würzburg für die Gewinnung der Gewebeproben.
- Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Professor Dr. Georg Krohne für die Anfertigung der Rasterelektronenaufnahmen am Biozentrum der Universität Würzburg.
- Bei Herrn Diplom-Mathematiker Johannes Hain des Lehrstuhls für Mathematik VIII-Statistik an der Universität Würzburg für die kompetente statistische Beratung.
- Bei meinen Eltern für ihre vielseitige Unterstützung und Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit.