
AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROFESSOR DR. MED. MICHAEL NERLICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

HORMONELLE STIMULATION DER
GELENKKNORPELWUNDHEILUNG IM VERGLEICH ZU
KNORPELREGENERATEN

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Achim Benditz

2008

AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROFESSOR DR. MED. MICHAEL NERLICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

HORMONELLE STIMULATION DER
GELENKKNORPELWUNDHEILUNG IM VERGLEICH ZU
KNORPELREGENERATEN

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Achim Benditz

2008

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Carsten Englert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer H. Straub

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Oktober 2008

MEINEM GELIEBTEN VATER (1949-2007)

UND MEINER GELIEBTEN MUTTER

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	6
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
3	EINLEITUNG	10
3.1	FRAGESTELLUNG	15
4	MATERIAL UND METHODEN	16
4.1	MATERIAL	16
4.2	METHODEN	17
4.2.1	<i>In vitro Gelenkknorpelintegrationsmodell</i>	<i>17</i>
4.2.2	<i>Vitalitätstest der Gewebekulturen</i>	<i>19</i>
4.2.3	<i>Mechanische Integrationsmessung der Knorpelblockgewebe.....</i>	<i>21</i>
4.2.4	<i>Histologische Untersuchung der Gelenkknorpelintegration in vitro</i>	<i>23</i>
4.2.5	<i>Proteoglykanmessung der Knorpelblöcke.....</i>	<i>24</i>
4.2.6	<i>DNA Messung der Knorpelblöcke.....</i>	<i>25</i>
4.2.7	<i>Kollagengehaltmessung der Knorpelblöcke.....</i>	<i>25</i>
4.2.8	<i>Statistik.....</i>	<i>26</i>
5	BEFUNDE	27
5.1	VORVERSUCHE	27
5.1.1	<i>Validierung der Gewebepräparation</i>	<i>27</i>
5.1.2	<i>Einfluss der Gelenkknorpelschichtdicke auf die Gelenkknorpelintegration in vitro</i>	<i>27</i>
5.1.3	<i>Einfluss der Insulinkonzentration auf die Stimulation der Gelenkknorpelintegration</i>	<i>28</i>
5.2	STIMULATION DER GELENKKNORPELTEGRATION DURCH INSULIN	29
5.2.1	<i>Einfluss der Insulinkonzentration auf die Stimulation der Gelenkknorpelintegration</i>	<i>29</i>
5.2.2	<i>Befunde der Glykosaminoglykan- und DNA Analyse.....</i>	<i>30</i>
5.2.3	<i>Histologische Untersuchung der mit Insulin stimulierten Gewebekultur.....</i>	<i>32</i>
5.3	STIMULATION DER GELENKKNORPELTEGRATION DURCH TESTOSTERON UND IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTURDAUER	33

5.3.1	<i>Einfluss des Steroidhormons und der Kultivierungsdauer auf die Gelenkknorpelintegration</i>	33
5.3.2	<i>Befunde der Glykosaminoglykan- und DNA Analyse</i>	34
5.3.3	<i>Histologische Untersuchung der mit Testosteron stimulierten Gewebekultur</i>	36
5.4	VERGLEICH DER OBEN AUFGEFÜHRTEN DATEN DER GELENKKNORPEL INTEGRATION ZUR INTEGRATION DES REGENERATKNORPELS ZU NATIVEM GELENKKNORPEL (IN ZUSAMMENARBEIT MIT W. STOSIEK)	37
5.4.1	<i>Einfluss der Kulturdauer auf die Gelenkknorpelintegration</i>	37
5.4.2	<i>Einfluss von Insulin und Testosteron auf die Integration von Regeneratknorpel und nativen Gelenkknorpelblöcken</i>	38
5.4.3	<i>Befunde der Glykosaminoglykan- und DNA Analyse</i>	40
5.4.4	<i>Histologische Untersuchung der Gewebepaarpaare und der Integrationszone</i>	44
6	DISKUSSION	46
6.1	VALIDIERUNG DES VERSUCHSMODELLS	46
6.2	EINFLUSS DES BOTENSTOFFES INSULIN AUF DIE GELENKKNORPEL INTEGRATION	47
6.3	EINFLUSS DES BOTENSTOFFES TESTOSTERON AUF DIE GELENKKNORPEL INTEGRATION	48
6.4	VERGLEICH DES EINFLUSSES VON INSULIN UND TESTOSTERON AUF DIE INTEGRATION VON GELENKKNORPEL UND REGENERATKNORPEL	49
7	ZUSAMMENFASSUNG	52
8	LITERATUR	54
9	LEBENS LAUF	59
10	DANKSAGUNG	61
11	ANHANG	62
11.1	PUBLIKATION	62
	HORMONAL EFFECTS ON NATIVE AND TISSUE ENGINEERED ARTICULAR CARTILAGE INTEGRATION	62
11.2	DOKTORANDENVERTRAG	65

2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Grafische Darstellung des Modellaufbaus mit Probenpräparation
- Abbildung 2a/b:** Beispiel einer Live/Dead-Kit Untersuchung
- Abbildung 3:** Technische Zeichnung der selbst gefertigten Einspannungsvorrichtung für Gelenkknorpelintegrationsproben
- Abbildung 4:** Stimulation der *nativen* Gelenkknorpelintegration mit Testosteron in Abhängigkeit von der Schichtdicke der Knorpelblöcke
- Abbildung 5:** Vorversuch zur *nativen* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration
- Abbildung 6:** *native* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration
- Abbildung 7:** Glykosaminoglykankonzentration der *nativen* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von Insulin
- Abbildung 8:** DNA Konzentration der *nativen* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von Insulin
- Abbildung 9:** lichtmikroskopische Aufnahmen der insulinabhängigen Gelenkknorpelintegration
- Abbildung 10:** *native* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und von der Steroidhormonstimulation
- Abbildung 11:** Glykosaminoglykankonzentration der *nativen* Gelenkknorpelproben in Abhängigkeit von Insulin und Testosteron
- Abbildung 12:** DNA-Konzentration der *nativen* Gelenkknorpelproben in Abhängigkeit von Insulin und Testosteron
- Abbildung 13:** lichtmikroskopische Aufnahmen der testosteronabhängigen Gelenkknorpelintegration
- Abbildung 14:** Darstellung der mechanischen Integration von Regeneratknorpel zu *nativem* Gelenkknorpel und zwischen zwei Gelenkknorpelblöcken
- Abbildung 15:** Integration von Regeneratknorpel im Vergleich zu *nativem* Gelenkknorpel in Abhängigkeit von Insulin und Testosteron
- Abbildung 16:** Glykosaminoglykankonzentration der Regeneratknorpel und *nativer* Gelenkknorpelproben in Abhängigkeit von Insulin und Testosteron
-

- Abbildung 17:** DNA-Konzentration der Regeneratknorpel und der *nativen* Gelenkknorpelproben in Abhängigkeit von Insulin und Testosteron
- Abbildung 18:** lichtmikroskopische Aufnahmen der Gelenkknorpelintegration von *nativem* Gelenkknorpel im Vergleich zu Regeneratknorpel
-

3 Einleitung

Gelenkbeteiligende Brüche sind schwere Verletzungen. Der Gelenkknorpel weist eine begrenzte Heilungskapazität auf. Meist heilt er im Vergleich zu Knochen ohne Überbrücken des Narbengewebes. Der darunter liegende Knochen heilt mit einer festen Knochenbrücke der Fragmente regelhaft gut aus[1,2]. Dieser Unterschied zwischen Knochen und Gelenkknorpelgewebe könnte an der unterschiedlichen Durchblutung und Innervation als auch an der Gelenkflüssigkeit liegen. Das Gelenkknorpelgewebe ist weder durchblutet noch innerviert, die Ernährung erfolgt vornehmlich durch Diffusion von Nährstoffen aus der Gelenkhaut, der Synovia. In der feingeweblichen Untersuchung stellt sich das Knorpelgewebe mit einem Anteil von 1-5% Knorpelzellen und einem größeren Anteil Bindegewebe, der extrazellulären Matrix dar. Die extrazelluläre Matrix besteht aus einem arkadenförmig aufgebauten Kollagenfibrillennetzwerk, welches eine hohe Zug- und Reißfestigkeit aufweist. In diesem sind lange Proteinketten mit gebundenen funktionellen Gruppen, den Proteoglykan und Glykoproteinen enthalten. Diese Glykoproteine sind osmotisch wirksam und ziehen Wassermoleküle an, was den Gelenkknorpel anschwellen lässt. Das Bindegewebsnetz des Gelenkknorpels steht diesem osmotischen Druck entgegen, so dass der Gelenkknorpel auf Druck Wasser verliert und nach Druckentlastung das verlorene Wasser wieder anzieht. Dieses Verhalten des Gelenkknorpels wird als viscoelastisches Druckverhalten beschrieben. Es wurde spekuliert, dass durch den hohen Wassergehalt des Gelenkknorpels und durch das Anschwellen des Gelenkknorpels nach einer Verletzung eine Heilung ausgeschlossen ist[3]. Meist bildet sich nach einer Verletzung des Gelenkknorpels minderwertiger Faserknorpel aus [4]. Dieser ist weich, weniger elastisch, rau an der Oberfläche und mechanisch geringer belastbar. Diese Veränderungen des Gelenkknorpels nach einer Verletzung können einen vorzeitigen Gelenkverschleiß einleiten. Deshalb wird nach den pathophysiologischen

Grundlagen der verminderten Heilungskapazität und therapeutischen Möglichkeiten zur Verbesserung der Gelenkknorpelwundheilung geforscht.

In vitro Gewebeuntersuchungen mit Gelenkknorpel warfen einen neuen Aspekt auf die Gelenkknorpelwundheilung in der zuvor gefestigten Meinung, dass Gelenkknorpel nicht wieder zusammen wachsen könne. Scully legte zwei Knorpelblöcke *in vitro* aufeinander und wies eine Integration der Blöcke nach[5]. *In vitro* Knorpelgewebsuntersuchungen konnten im Weiteren zeigen, dass die Integration maßgeblich von lebenden Knorpelzellen, dessen Kollagensynthese, der Kollagenanlagerung und dessen Quervernetzung abhängig ist[6-10]. Die Ausprägung der Entzündungsreaktion des Gewebes, gesteuert von Botenstoffen, konnte ebenfalls als beeinflussender Faktor für die Gelenkknorpelheilung dargestellt werden[11-14]. Botenstoffe können Entzündungsreaktionen katabol beeinflussen, so dass es zu einem zunehmenden Abbau des Gewebes kommt[12,14,15]. Botenstoffe treten ubiquitär im menschlichen Körper auf und sind unter anderem für die Steuerung des Gelenkknorpelstoffwechsels mit verantwortlich. Hormone, eine Gruppe der Botenstoffe ist wesentlich an der Regulierung des Entzündungs- und Heilungsprozesses vom Gewebe beteiligt [16-19]. Aus der Gruppe der Peptidhormone ist Insulin für die Regulierung der Stoffwechselaktivität bekannt[20,21]. Es wirkt regulierend auf den Glucosestoffwechsel sowie auf die Zellsynthese und Zellteilung. Insulin wird von den Langerhansschen Zellen des Pankreas gebildet. Es ist von entscheidender Bedeutung für den Zuckerhaushalt [22]. Darüber hinaus reguliert Insulin an verschiedenen Gewebearten den Umbau von Proteinen und Fetten [23,24]. Das Proteohormon „Insulin-like Growth Factor I“ (IGF-I) ist dem Insulin sehr ähnlich und steuert ebenfalls das Wachstums- und Differenzierungsverhalten verschiedener Gewebearten [25-27]. Im Unterschied zum Insulin zirkuliert IGF-I nicht frei im Blutkreislauf, sondern liegt gebunden an Proteinstrukturen vor. Die Rezeptoren für Insulin und IGF-I an der Zelloberfläche haben eine ca. 50 % Übereinstimmung, so dass es zu ähnlichen Wirkungen

von Insulin und IGF-1 an den Gewebearten kommt. Dies liegt an der hohen Ähnlichkeit/Homologie der molekularen Struktur der beiden Moleküle [28].

Insulin oder auch Insulin-like Growth Factor (IGF-1) werden vielfach in der Gewebezüchtung z. B. für die Züchtung von Gelenkknorpelregeneraten verwendet. Dabei zeigt sich, dass IGF-I das Nassgewicht der Gelenkknorpelregenerate wie auch den Anteil an Extrazellulärmatrix deutlich erhöht [29]. Zudem steigert IGF-1 in Gelenkknorpelregeneraten mit geringer Zelldichte den Glykosaminoglykangehalt um das Fünffache [30]. Ein wichtiger Faktor für die Gelenkknorpelintegration ist die Anlagerung von Kollagen an den Grenzflächen des Knorpels. Wachstumsfaktoren wirken auf den Kollagenstoffwechsel von Knorpelzellen [31,32]. Es wurde gezeigt, dass es bei der Heilung von Knorpelverletzungen zu einer vermehrten Expression des IGF-1 Gens kommt [33]. Kürzlich konnte dargestellt werden, dass Insulin vor allem in einer Konzentration von 2,5µg/ml die selben Effekte auf Regeneratknorpel besitzt wie IGF-1 [34].

Bei der Integration von Gelenkknorpel *in vitro* ist der Einfluss von Insulin untersucht worden. Dabei stellte sich eine dosisabhängige Wirkung dar [35-37]. Regeneratgelenkknorpel wird häufig mit diesem Botenstoff hergestellt [30].

Somit könnte dieser auch für die Integration von Regeneratgelenkknorpel zum *nativen* Gelenkknorpel ein wichtiger stimulierender Faktor sein, was in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Steroidhormone haben ähnlich wie Insulin einen stimulierenden Effekt auf das Knorpelgewebe [19]. Untersuchungen zur mechanischen Qualität des Gewebes zeigten, dass die Testosteronkonzentration im Knie Einfluss auf das Volumen und die Qualität des Gelenkknorpels nimmt [38]. Es wird vermutet, dass es Unterschiede nach Geschlecht gibt. Dies wird versucht in aktuellen empirischen und experimentellen Studien nachzuweisen [39-41]. Östrogen, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Testosteron hatten dosisabhängig einen

stimulierenden Einfluss auf die Gelenkknorpelintegration. Das Sexualhormon Testosteron wies dabei den größten dosisabhängig stimulierenden Wirkungsbereich auf [19]. Dieser Effekt konnte in weiteren Studien in ähnlicher Form nachgewiesen werden [42].

Neue therapeutische Optionen in der Behandlung von Gelenkknorpelverletzungen beschäftigen sich mit der autologen Chondrocytentransplantation (ACT) [43] und neuerdings auch mit der matrixgestützten autologen Chondrocytentransplantation (MACT)[44,45]. Dazu wurden Techniken entwickelt, um Regeneratknorpel zu züchten. Die Integration von Regeneratknorpel erscheint jedoch wesentlich schwieriger zu gelingen als die Integration von *nativem* und *nativem* Knorpelgewebe. Es finden sich wenige Arbeitsgruppen, die sich *in vitro* [46-48] oder *in vivo* [49] mit der Integration von Regeneratknorpelgewebe (MACT) befassen. Obradovic war der Erste, der mit Chondrocyten von Kälbern Regeneratknorpel züchtete und diesen auf seine mechanische Integrationsfähigkeit in einem Push-out Modell untersuchte[50]. Dabei wurde ein ringförmiges Regeneratknorpelstück in eine dafür vorgesehene Aussparung gesetzt und anschließend die Kraft gemessen, welche benötigt wird, um das Knorpelstück nach der Integration herauszudrücken. Es zeigte sich, dass die Integrationsstärke mit dem Alter des Spenderkalbs abnahm. Hunter und Levenston, die ein ähnliches Modell wie Obradovic verwendeten, konnten zeigen, dass die Reifung des Regeneratknorpelgewebes von dem umgebenden nativen Gelenkknorpel abhängig ist[3].

Tognana et al. zeigten, dass sich die mechanische Integration von Regeneratknorpel mit der Kultivierungsdauer steigerte[51]. Zhang et al. konzentrierten sich bei Versuchen mit einem gleichartigen Modell auf die Zellvitalität und demonstrierten, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen der Zahl der vitalen Zellen und der Integrationsstärke gibt[52].

Alle diese Studien haben gemeinsam, dass sie die Integration von Regeneratknorpel und *nativem* Gelenkknorpel in einem ringförmigen Push-up Modell untersuchten. Obwohl diese Versuche zu wertvollen Einblicken in den Integrationsprozess führen, haben sie alle einen

entscheidenden Nachteil: Unerwünschte Press-fit Effekte, d. h. eingebrachte Knorpelstücke können sich mechanisch in der ringförmigen Aussparung verkanten und stecken bleiben, können nicht von der tatsächlichen Integrationsleistung durch Gewebebrücken unterschieden werden. Um diesen Nachteil zu Umgehen und Ergebnisse höherer klinischer Relevanz zu erhalten, wurde in den letzten Jahren ein Scherbruchversuch eingeführt, welcher schon in unserer Arbeitsgruppe verwendet wurde[19] und auch in dieser Arbeit angewendet wird.

Obwohl die generelle Realisierbarkeit der Regeneratknorpelintegration mehrfach bewiesen wurde, gibt es keine Studien hinsichtlich der Effekte der Steroidhormonstimulation und der Stimulation mit Insulin im Vergleich zur Integration von *nativem* und *nativem* Knorpelgewebe.

3.1 Fragestellung

1. Wie wirkt sich die dosisabhängige Stimulation mit Insulin auf die mechanische Integration von Gelenkknorpel *in vitro* aus?
 - a. Welche strukturellen Effekte auf das Gewebe hat die dosisabhängige Stimulation mit Insulin?
2. Wie wirkt sich die Stimulation mit Testosteron auf die mechanische Integration von Gelenkknorpel *in vitro* aus?
 - a. Welche strukturellen Effekte auf das Gewebe hat die Stimulation mit Testosteron?
3. Wie wirkt sich die Stimulation mit Testosteron und Insulin auf die mechanische Integration von Regeneratgelenkknorpel *in vitro* aus?
 - a. Welche strukturellen Effekte hat die Stimulation mit den Botenstoffen auf den Regeneratknorpel?
 - b. Bestehen Unterschiede von Gelenkknorpel- zu Regeneratknorpelgewebe?

4 Material und Methoden

4.1 Material

Substanz	Bezeichnung	Hersteller	Ort/Land
Typ II Kollagenase		CellSystem	St. Katharinen, Deutschland
Papainase		CellSystem	St. Katharinen, Deutschland
Fötale Bovines Serum	FBS	PAN	Deutschland
High Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium	31885-023, DMEM	Gibco	Deutschland
Calcium- and Magnesium freier Phosphatsalzpuffer	PBS	Gibco	Deutschland
nicht-essentielle Aminosäuren	11140-035	Gibco	Deutschland
L-Glutamin	25030-024	Gibco	
Prolin	81709	Fluka	Deutschland
Ascorbinsäure	A-0278	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ascorbinsäure-2-Phosphat	A-8960	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Desoxyribonucleinsäure	DNA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dimethylmethyleneblau		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eosin		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Hematoxylin		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
N-2-hydroxyethylpiperazin N'-2-ethansulfonsäure	15630-056, HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin	15070-022	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Safranin-O		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypanblau		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Diaminobenzidin	DAB	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Testosteron	T 1500	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Oestrogen	17-β-Estradiol, E8875	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trans-Dehydroepiandrosteron	D 4000, DHEA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
rekombinantes humanes IL-1β	I 94401	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Formalin 37 %		Merck	Darmstadt, Deutschland
p-Dimethylaminobenzaldehyd	p-DAB	Merck	Darmstadt, Deutschland
Bovines Insulin (Pankreas)		Merck	Darmstadt, Deutschland
Antikörper gegen Kollagen Typ I und II		Biotrend	Köln, Deutschland
StreptABComplex/HRP mouse/rabbit		DAKO A/S	Dänemark
Rekombinantes humanes IGF-I		Roche Pharma Research	Penzberg, Deutschland
Nadeln		Unimed	Lausanne, Schweiz
Assay			
L- Cystein		Merck	Darmstadt, Deutschland
Na ₂ EDTA		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DANN			
Höchst Dye	Sigma #33258	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris		Carl Roth GmBh	Karlsruhe, Deutschland
NaCl			
Chondroitinsulfat A			
1,9 Dimethylmethyleneblau	DMMB	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut		J. T. Baker	Deventer, Holland
Ameisensäure	Formic acid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumformiat	Sodium formate		
Papain		Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Gewebe	Gelenkknorpel	Lokale Metzgereien (Fam. Stiersforfer)	Wenzenbach, Deutschland

4.2 Methoden

4.2.1 *In vitro* Gelenkknorpelintegrationsmodell

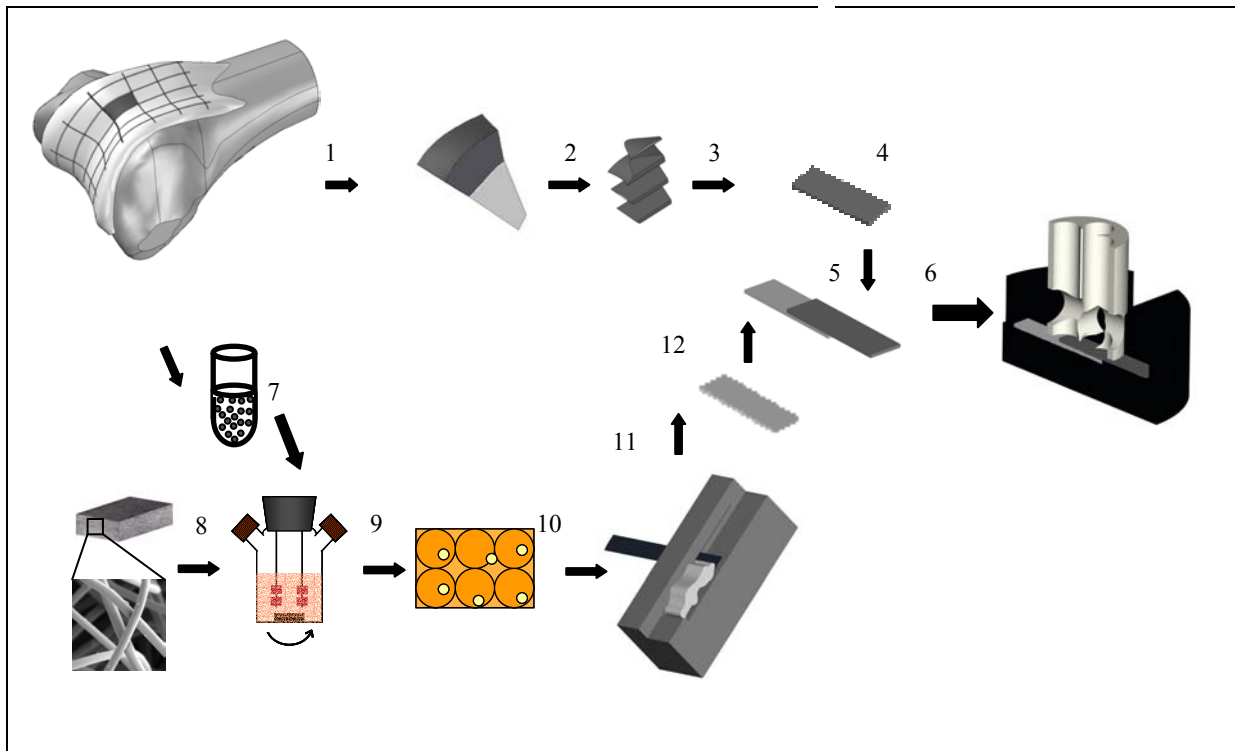


Abbildung 1: Grafische Darstellung des Modellaufbaus mit Probenpräparation

Präparationsdarstellung des nativen Gelenkknorpels (1-4) und technisch hergestellten Gelenkknorpelblöcken (7-12). Die Gelenkknorpelblöcke (4) können in Paaren in einer speziellen Kulturkammer (6) mit einer Überlappungszone kultiviert werden, oder mit einem Regeneratknorpelstück gleicher Größe (12).

Es wird ein bovines *in vitro* Tierversuchsmodell zur Gelenkknorpelintegration verwendet. Dieses Modell ist erstmals von Reindel beschrieben [10,19].

Aus den Hinterbeinen von 8 bis 12 Wochen alten Kälbern werden unmittelbar nach Schlachtung des Tieres Knorpelblöcke aus dem femuropatellaren Gleitlager entnommen. Unter sterilen Bedingungen wird das Femur proximal vom Hautweichteilmantel befreit und in einem Schraubstock eingespannt. Unter ständiger Hydrierung des Gewebes mit PBS mit 1% Antibiotikumzusatz wird das Kniegelenk über eine mediale Arthrotomie eröffnet. Aus dem

femuropatellaren Gleitlager werden mit einer oszillierenden Säge 6 bis 9 Knorpel-Knochenblöcke mit einer angestrebten Kantenlänge von 10 mm und einer Höhe von 20 mm gesägt (siehe Abbildung 1). Die Knorpelknochenblöcke werden bei 4°C in PBS-Lösung aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden weiter verarbeitet.

Die osteochondralen Knorpelknochenblöcke (2) werden in einem Schlittenmikrotom (HM440, Firma Microm, Deutschland) mit dem knöchernen Anteil eingespannt und von der Gelenkfläche auf den Knochen zugehend in Knorpelscheiben einer definierten Dicke von 250µm geschnitten (siehe Abbildung 1: 3). Die ersten beiden abgeschnittenen Knorpelscheiben werden immer verworfen, da diese die Gelenkfläche ganz oder aufgrund der Kurvation des Gelenkes, noch teilweise tragen. So werden nur Knorpelscheiben aus der mittleren Gelenkknorpelregion mit einer Tiefe von ca. 500µm bis 1000µm verwendet werden. Aus diesen Knorpelscheiben werden 2 bis 4 definierte Knorpelblöcke mit einer Kantenlänge von 8 mal 2,5mm präpariert (4). Dies erfolgt mit zwei selbst gefertigten Schneideblöcken, in welchen Rasierklingen eingespannt werden. Immer zwei dieser Knorpelblöcke werden so in einer Kulturkammer platziert (6), dass sie sich zur Hälfte überlappen (5). In dieser Form werden die Gewebeproben in 24-well plates für 14 oder 28 Tage in einem Kulturschrank (Typ Heraeus H330) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

In gleicher Weise werden Gewebsblockpaare (Gelenkknorpelblock auf Regeneratknorpelblock (5)) von einem anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe kultiviert (6). Der Regeneratknorpel wird acht Wochen zuvor durch die Isolierung von Chondrozyten (7) aus dem knorpeligen Anteil der Knorpelknochenblöcke (Abbildung 2 (1)) und Kultivierung mit einer Polyglycolmatrix (8) gezüchtet. Die Besiedlung der Matrix mit Chondrocyten erfolgt über so genannte spinner flasks (9). Dabei werden in einem Medium, in dem sich die Knorpelzellen befinden, die Matrices auf einem Dorn gedreht. Die Knorpelzellen können innerhalb von 12 Stunden in dem bewegten Medium auf der Matrix adhären. Die

zellbeladenen Matrices Konstrukte werden in 6 well-plates (10) für acht Wochen kultiviert. Die in dieser Zeit zu festen matrixhaltigen Konstrukten angewachsenen Matrices werden nun als Knorpelkonstrukt bezeichnet und werden mit selbst hergestellten Schneidewerkzeugen (11) in definierte Regeneratknorpelblöcke (12) zugeschnitten.

***In vitro* Gewebekultur**

Die Proben werden in 24-well-plates mit 750 µl Medium bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Das Standardmedium enthält: Dulbeccos modified eagle medium (DMEM) mit 10 mM HEPES, 10 % fetales bovines Serum, 0,1 mM nicht essentiellen Aminosäuren, 0,4 mM Prolin sowie Vitamin C 2-Phosphat 100 µg/ml. Das Medium wird jeden zweiten Tag gewechselt.

Dem Standardkulturmedium werden die in der Tabelle 1 angeführten Konzentrationen von Wachstumsfaktoren zugegeben.

Wachstumsfaktor	Konzentration I	Konzentration II	Konzentration III	Konzentration IV
Insulin	0,25 µl/ml	0,5 µl/ml	1,0 µl/ml	2,5 µl/ml
Testosteron	10 ⁻⁸ mol/l			

4.2.2 Vitalitätstest der Gewebekulturen

Für das Integrationsmodell nach Reindel ist die schonende Präparation der Knorpelblöcke und dessen Vitalität als Ausdruck des unveränderten Zellmetabolismus Voraussetzung. Deshalb wird nach der Knorpelblockpräparation ein Vitalitätstest durchgeführt.

Der Live/Dead Kit von Molecular Probes, Oreganon USA besteht aus zwei fluoreszierenden Farbstoffen. Einer ist das 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA), welches in einer Endkonzentration von 10µM im gemeinsamen 4ml Trägermedium verwendet wird. Dieser Farbstoff (CMFDA) kann frei in das Cytoplasma von eukaryonten Zellen diffundieren, jedoch nicht in einen gesunden Nucleus. Im Cytoplasma wird eine Acetatgruppe vom Farbstoff abgespalten, so dass bei 490nm dieser zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Der Farbstoff erscheint in der Fluoreszenzmikroskopie grün und ist ein Zeichen für eine vitale Zelle. Ist eine Zelle strukturell geschädigt, kann ein zweiter Farbstoff in den zerstörten Nucleus diffundieren und sich an das Erbgut, die DNA anlagern. In der Fluoreszenzmikroskopie erscheint die Zelle als Zeichen für eine Schädigung rot.

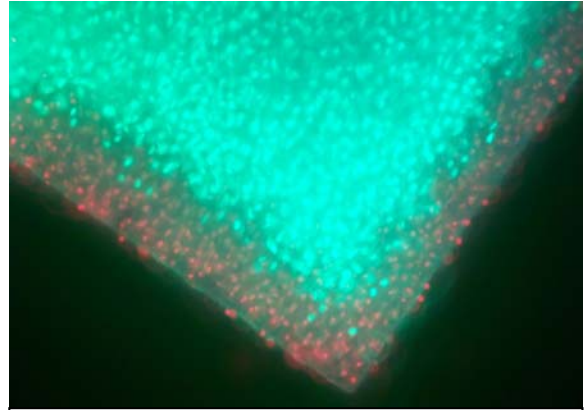


Abbildung 2a: Beispiel einer Live/Dead Kit Untersuchung. Die Schnittträger sind avital und rot gefärbt. Das sonstige Gewebe ist mit lebenden Zellen durchsetzt und grün gefärbt.

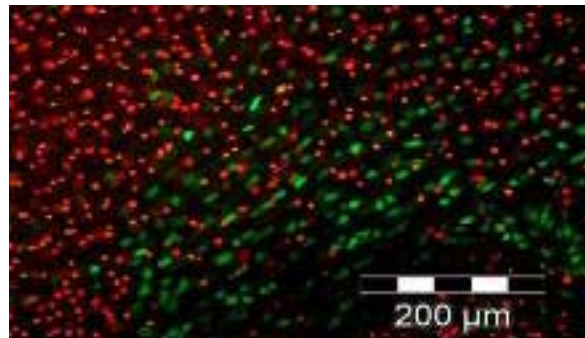


Abbildung 2b: Beispiel einer Live/Dead Kit Untersuchung von avitalem Knorpelgewebe (rot) mit einzelnen lebenden Zellen (grün).

Zur bildgebenden Darstellung wird ein Mikroskop (Leitz DM RBE) mit einer Wellenlänge 450nm-520nm verwendet. Die Bilder werden mit einem Objektiv (40fache Vergrößerung) und einer hoch auflösenden Digitalkamera (Spot2000) mit Softwarekontrolle (Software Metamorph, Universal Imaging Corporation, West Chester, NY, USA) aufgenommen. Die Auflösung beträgt 0,69 µm/Pixel. Diese Bilder werden anschließend im 16bit Modus als TIFF-Datei gespeichert und mit „Photoshop“ (Adobe) weiterverarbeitet. Für die

Integrationsversuche werden nur Knorpelblöcke mit einem grün/rot Quotienten von 9/1 eingesetzt.

4.2.3 Mechanische Integrationsmessung der Knorpelblockgewebe

Zur Bestimmung der Integrationsfläche wird jede Probe vor der mechanischen Integrationsmessung stereomikroskopisch analysiert. Hierfür dient ein Mikroskop des Typs Olympus SZX12.

Die paarigen Knorpelblöcke werden in eine mechanische Prüfmaschine Typ Hegewald&Peschke eingespannt (Abbildung 3). Um die Proben ohne Beschädigung einspannen zu können, kommen zwei unabhängige Prinzipien gleichzeitig zur Anwendung. Über ein Vakuum wird die Probe von den Einspannungsvorrichtungen angesaugt. Eine Vakuumpumpe (Pfeiffer DUO 012A Volumenstrom 12 l/h) erzeugt an den Ansaugstellen

(Durchmesser 1,2 mm)

eine Haltekraft von 0,2N abzüglich aller Verluste und Leckagen.

Zwei durch Federn vorgespannte Backen werden zusätzlich jeweils an den kopfseitigen Knorpelblock und an den fußseitigen Knorpel-

block angeklemmt. Die Spannkraft der Backen

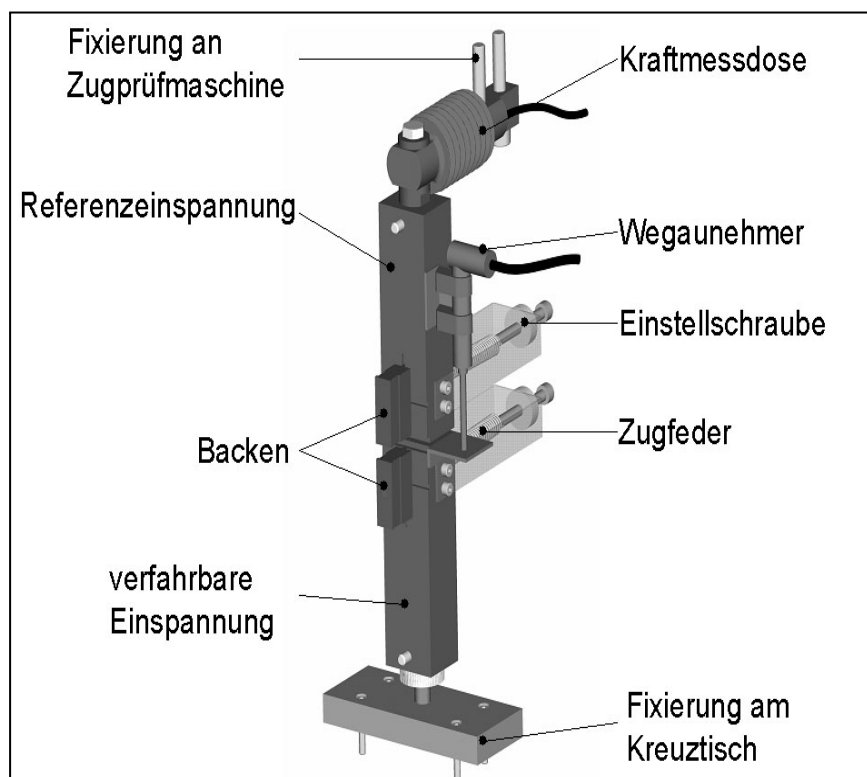


Abbildung 3: Technische Zeichnung der selbst gefertigten Einspannungsvorrichtung für Gelenkknorpelintegrationsproben.

kann über die Federkennlinie für jede Backe getrennt eingestellt werden. Die Einspannbacken halten die Proben an den beiden Enden auf einer Länge von 2 mm. Aufgrund der Probengeometrie ergibt sich eine Einspannungsfläche von 5 mm². Die Anpresskraft wird über die Vorspannung der Feder stufenlos eingestellt. Sie kann zwischen 5 N bis 20 N variiert werden. Somit kann ein maximaler Anpressdruck von 4 N/mm² erreicht werden. Bei diesem Anpressdruck liegt noch keine Schädigung oder Schwächung der Probe im Einspannungsbereich vor, aber ein Herausrutschen der Proben aus der Einspannvorrichtung verhindert wird (Abb. 3).

Die Aufnahme der Zugproben aus der Kulturkammer und die Übergabe an die Prüfmaschine erfolgen durch einen porösen Stempel mit variablem Vakuumsystem. Die Probe wird exakt senkrecht mittels einer vorgegebenen Einspannungsvorrichtung mit dem o. g. Vakuumsystem für die Probenaufnahme platziert. Über einen Anschlag wird gewährleistet, dass alle Versuchspräparate an ihren Enden reproduzierbar in der Probenhalterung gefasst werden. Der Bereich der Messlänge befindet sich somit immer exakt in der Mitte zwischen den Einspannungen. Die untere Aufnahme kann über einen spielfreien Kreutztisch (Leica Auflösung 0,01 mm) axial zentriert werden, so dass mögliche überlagerte Biegebelastungen ausgeschlossen werden können. Die Verfahrensgeschwindigkeit für die Zugversuche beträgt in allen Fällen 1mm/min.

Messdatenerfassung und Genauigkeit

Der Messbereich der für den Zugversuch verwendeten Kraftmessdose beträgt $10\text{N} \pm 0,02\text{N}$. Das elektronische Kraftsignal der Messdose wird auf 10V verstärkt und steht an einem Analogausgang zur Verfügung.

Die Längenänderung der Proben während des Versuchs wird über einen induktiven Wegaufnehmer (HBM WA/10mm) mit einem Messbereich von $5\text{mm} \pm 0,01\text{mm}$ indirekt über

die Einspannvorrichtung aufgenommen. Der Grundkörper des Aufnehmers ist direkt an der Referenzeinspannung befestigt. Der frei bewegliche Anker liegt auf der unteren Einspannvorrichtung auf. Die Prüfdistanz zwischen den Einspannungen beträgt 8mm. Diese wird mit einem Endmaß ($8\text{mm} \pm 0,001\text{mm}$) exakt justiert und über einen Endanschlag an der Zugprüfmaschine fixiert. Sie stellt somit die Ausgangslänge l_0 für alle Zugversuche dar.

Das elektronische Signal des induktiven Wegaufnehmers wird durch einen 5kHz-Trägerfrequenzmessverstärker ebenfalls auf 10V verstärkt. Nach dem elektrischen Abgleich von Verstärker und Aufnehmer werden mit Hilfe einer Mikrometerschraube (Steinmeyer $25\text{mm} \pm 0,01\text{mm}$) die Kalibrierwerte zwischen Weg und dem entsprechenden Signal ermittelt. Die beiden aufbereiteten differentiellen Analogsignale werden über eine Anschlusseinheit (National Instruments, SCB 68) der Datenerfassungskarte (National Instruments PCI-MIO-16E-4) und eine 12 Bit AD-Wandlung mit einer Auflösung von 5mV/V weiterverarbeitet. Die Auflösung des Kraftsignals beträgt $\pm 0,08\text{N}$, die erzielte Genauigkeit der Verformung liegt bei $\pm 0,06\text{mm}$.

Zur Verarbeitung der Messsignale wurde in LABView ein geeignetes Programm erstellt. Die hardwaregetriggerte Abtastrate beträgt 20Hz. In der Software wurde ein elektronischer Filter integriert, um das hochfrequente Rauschen des Maschinensignals zu unterdrücken. Alle Messwerte werden als Textdateien gespeichert und können so mit verschiedenen Programmen ausgewertet werden.

4.2.4 Histologische Untersuchung der Gelenkknorpelintegration *in vitro*

Ein Teil der Stichproben wird für histologische Untersuchungen präpariert, indem diese in einer 2%igen Glutaraldehydlösung konserviert werden. Nach 30min werden die Proben in 10% Formalin oder durch Einfrieren bei -18°C fixiert. Die Formalin-fixierten Proben werden in Paraffin eingebettet und Querschnitte mit einer Schnittdicke von 5 μm angefertigt.

Entparaffinierte Schnitte werden mit Hematoxylin und Eosin (H&E) auf Zellularität und mit Dimethylmethylenblau auf Glykosaminoglykan (GAG)[53] gefärbt. Aus den gefrorenen Proben werden Gefrierschnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen und Typ II Kollagen beimpft. Durch einen zweiten Antikörper gegen den ersten Antikörper beladen mit DAB kann dieser sichtbar gemacht werden (StreptAvidinBiotin-Kits).

4.2.5 Proteoglykanmessung der Knorpelblöcke

Ein Teil der Stichproben wird nach den Zugversuchen mit einem Papain-Puffer (bez. auf 50ml PBS: 0.0363g L-Cystein, 0.1117g Na₂EDTA → pH 6.0, 326µl Papain) versetzt, über 18h bei 60°C verdaut und anschließend bei -78°C gelagert.

Zudem werden 8 Proben für die Standard-Kurve mit einem Chondroitinsulfat-Gehalt von 7mg/ml in oben beschriebenen Papain-Puffer bei 60°C über 18h verdaut. Daraus werden die Standards mit einer Verdünnungsreihe von 40µg/ml, 30µg/ml, 20µg/ml, 15µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml und 1,25µg/ml mit oben beschriebenen Papain-Puffer hergestellt.

Das DMMB Reagenz wird wie folgt hergestellt: 18.0mg 1,9 Dimethylethylenblau (DMMB) werden in 5ml absoluten Alkohol gelöst. Dazu gibt man 2.0ml Ameisensäure und 2.0g Natriumformiat. Das Gemisch wird mit dH₂O auf ein Endvolumen von 1l gebracht, wobei der pH bei 3.0 liegt.

Die Proben werden jeweils dreifach in ein 96 well-plate in einer Menge von 50µl/well eingebracht, mit 200µl DMMB-Reagenz versetzt und gleich im Anschluss bei 570nm vermessen. Aus der dreimal gemessenen Extinktion einer Probe errechnet sich bezogen auf die Standardkurve der Glykosaminoglykangehalt.

4.2.6 DNA Messung der Knorpelblöcke

Aus aufgereinigter DNA werden 8 Proben für die Standard-Kurve des DNA-Assays hergestellt. Die Stammlösung wird mit 5mg/ml DNA angesetzt und zusammen mit den Untersuchungsproben in oben beschriebenen Papain-Puffer bei 60°C über 18h verdaut.

Daraus werden die Standards mit einer Verdünnungsreihe von 40µg/ml, 30µg/ml, 20µg/ml, 15µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml und 1,25µg/ml hergestellt.

Der verwendete Assay-Puffer wird wie folgt hergestellt: Hoechst Dye (#33258) wird lichtgeschützt 1mg/ml in dH₂O gelöst und mit einem TNE-Puffer auf 1µl Hoechst Dye Stock und 10ml TNE aufgefüllt.

Der TNE-Puffer wird wie folgt hergestellt: 10xTNE besteht aus 12.11g Tris 100mM, 3.72g EDTA Na₂H₂O 10mM, 116.89 NaCl 2M, aufgefüllt mit 800ml dH₂O, mit konz. HCl auf pH 7.4 eingestellt, auf 1l Volumen gebracht und im Anschluss auf 1 x TNE verdünnt.

Die Proben werden jeweils dreifach in ein 96 well-plate in einer Menge von 10µl/well eingebracht, mit 200µl Assay-Puffer versetzt und gleich im Anschluss bei 360nm vermessen.

Aus der dreimal gemessenen Extinktion einer Probe errechnet sich bezogen auf die Standardkurve der DNA-Gehalt.

4.2.7 Kollagengehaltmessung der Knorpelblöcke

Zu den Standards und Proben werden 100 µl rauchende Salzsäure (37 %) gegeben und diese über ca. 16 h bei 105°C hydrolysiert.

Die Salzsäure wird im leichten Stickstoffstrom bei ca. 40 °C im Abzug abgeraucht und trockene Proben in 500 µl Wasser aufgenommen (Verdünnen der Salzsäurekonzentration).

100 µl davon werden in 96-well gegeben (Standard und Proben) und mit 50 µl Chloramin-T-Lösung nach kurzen Vortexen inkubiert. Im Anschluss gibt man 50 µl DAB-Lösung zu und

vortext, bis keine Schlieren erkennbar sind. Die Proben werden über 30 min bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert.

Nach dem Abkühlen werden die Proben bei 557 nm [54] im Plattenscanner vermessen.

Die Menge an Gesamtkollagen wird aus dem Verhältnis von Hydroxyprolin zu Prolin (theoretisch 1:10) berechnet [55].

4.2.8 Statistik

Die Datenerfassung und tabellarische Vorauswertung wird mit Excel für Windows XP durchgeführt. Jede Stichprobe oder ein daraus durch eine Untersuchung abgeleiteter Wert wird numerisch codiert. Die schließende statistische Auswertung wird mit Hilfe von SPSS 16.0 deutsch für Windows durchgeführt. Eine Konsistenzprüfung erfolgt nach jeder Datenübertragung von Excel in SPSS. Die Stichprobenanzahl und Überprüfung der Normalverteilung wird durch den Kruskal-Wallis Test untersucht. Für nicht normal verteilte Werte kommt der Mann-Whitney-U Test zur Anwendung. Normalverteilte Werte werden durch eine einfaktorielle ANOVA Analyse und ggf. einen post-hoc Tukey Test auf signifikante Unterschiede analysiert. Die Signifikanz wird für beide Test mit einem $p \leq 0,05$ angenommen.

Die grafische Bearbeitung erfolgt mittels Excel XP 2003 und Sigma Plot 8.0 Software. Für nicht normal verteilte Werte wird eine Darstellung mit dem Median und dem 25 als 75 Quartile in Box-and-Whiskers Diagrammen gewählt. Für normal verteilte Werte wird der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

5 Befunde

5.1 Vorversuche

5.1.1 Validierung der Gewebepräparation

Die geometrische Ähnlichkeit der Formkörper wurde an 200 Blöcken stellvertretend für die Grundmenge untersucht. Mit einer Varianz in der Länge von $8\text{mm} \pm 0,06\text{mm}$ und in der Breite von $2,5\text{mm} \pm 0,05\text{mm}$ besteht eine hohe Reproduzierbarkeit in der Präparation der Proben durch das selbst angefertigte Schneidewerkzeug. Das durchschnittliche Gewicht beträgt $6,4\mu\text{g} \pm 0,1\mu\text{g}$.

5.1.2 Einfluss der Gelenkknorpelschichtdicke auf die Gelenkknorpelintegration *in vitro*

Zur weiteren Validierung des Integrationsmodells ist es von Interesse, ob die Knorpelschichtdicke für die Integration ein beeinflussender Faktor ist. Diesbezüglich werden Integrationsproben mit folgenden Schichtdicken präpariert und nach o. g. Standard kultiviert.

Der Versuch mit Knorpelblöcken verschiedener Schichtdicken erfolgte durch Stimu-

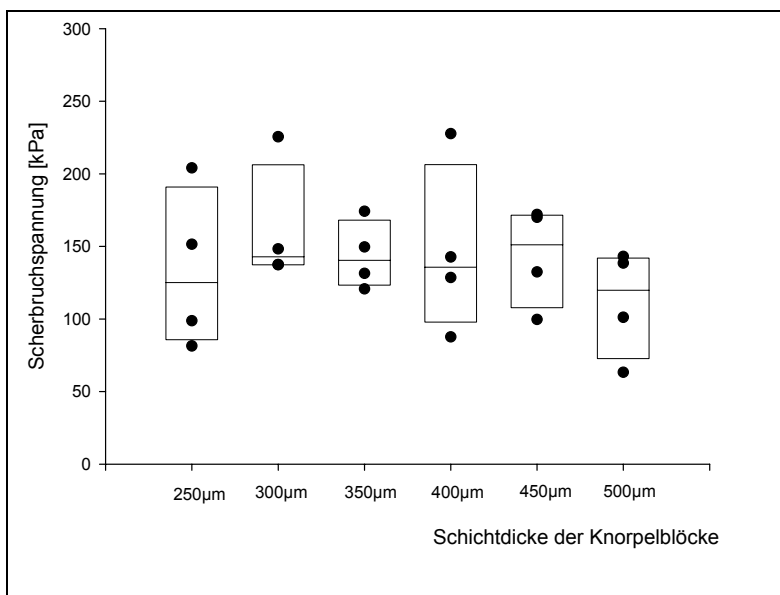


Abbildung 4: Es wird die Gelenkknorpelintegration *in vitro*, stimuliert mit dem Steroidhormon Testosteron in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l in Abhängigkeit von der Schichtdicke der Knorpelblöcke dargestellt. Die Box weist das 5/95 Konfidenzintervall mit Darstellung des Medians bei nicht normal verteilten Werten auf. Die einzelnen Punkte stellen jeweils einen Messwert dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht nicht.

lation mit Testosteron 10^{-8} mol/l im Standardmedium. Im Vergleich der einzelnen

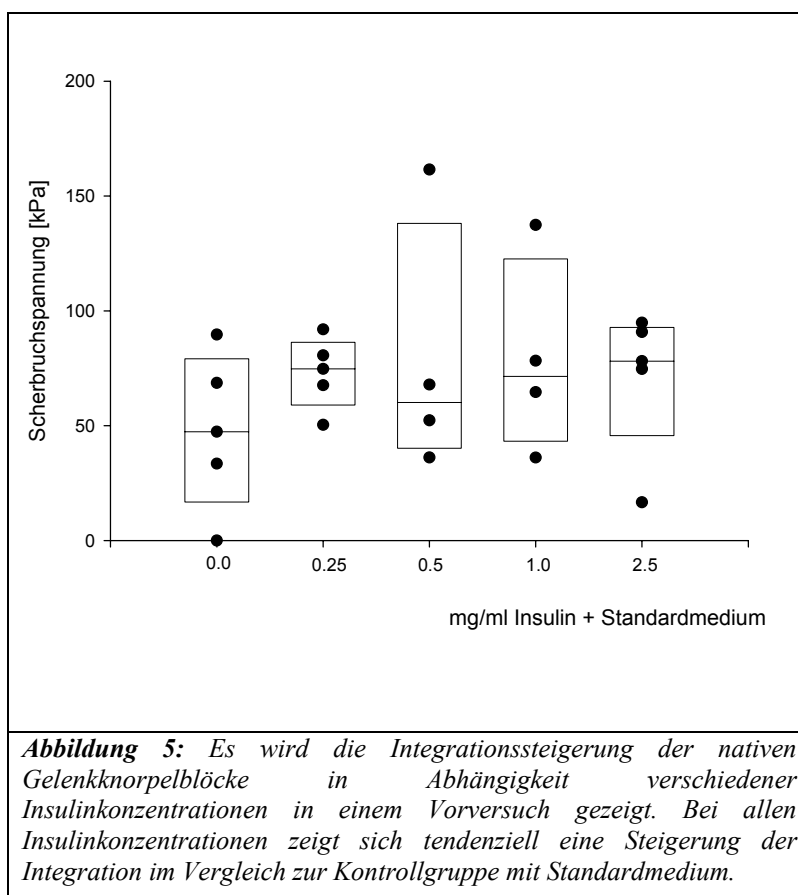
Schichtdicken untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Im Kurvenverlauf zeigt sich jedoch, dass mit zunehmender Schichtdicke die Integrationsleistung tendenziell abnimmt.

5.1.3 Einfluss der Insulinkonzentration auf die Stimulation der Gelenkknorpelintegration

In diesem Vorversuch wird die Integration von zwei Knorpelblöcken durch die u. g. Insulinkonzentrationen stimuliert. Da der Versuch nur eine Tendenz zeigen soll, wird die geringe Probenzahl toleriert. In der Zusammenschau zeigt sich in jeder der gewählten Insulinkonzentration eine Stimulation im Vergleich zur Kontrolle. Zwischen den einzelnen Insulinkonzentrationen sind keine erheblichen Unterschiede zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium mit einer medianen Scherbruchspannung von 48 kPa,

zeigte sich bei allen Insulinkonzentrationen im Median eine Steigerung der Integration. Bei einer Insulinkonzentration von $0,25\mu\text{g/ml}$ und bei einer Konzentration von $2,5\mu\text{g/ml}$ zeigte sich der deutlichste Anstieg der Integration.

Aufgrund dieser Ergebnisse des Vorversuchs wurden die Konzentrationen $0,25\mu\text{g/ml}$ und $2,5\mu\text{g/ml}$ im direkten



Vergleich von Regeneratknorpel und Gelenkknorpel verwendet.

5.2 Stimulation der Gelenkknorpelintegration durch Insulin

5.2.1 Einfluss der Insulinkonzentration auf die Stimulation der Gelenkknorpelintegration

Dargestellt ist die Scherbruchspannung als Maß für die Integration von *nativem* Gelenkknorpel in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin. Insulin wurde in den Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml verwendet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium wurde durch Stimulation mit Insulin 0,25µg/ml eine signifikante ($p < 0,02$) Integrationssteigerung von einem Median von 48,9 kPa auf 77,8 kPa erreicht. Mit einem p -Wert $< 0,002$ war die Integrationssteigerung mit Insulin 2,5 µg/ml ebenfalls signifikant.

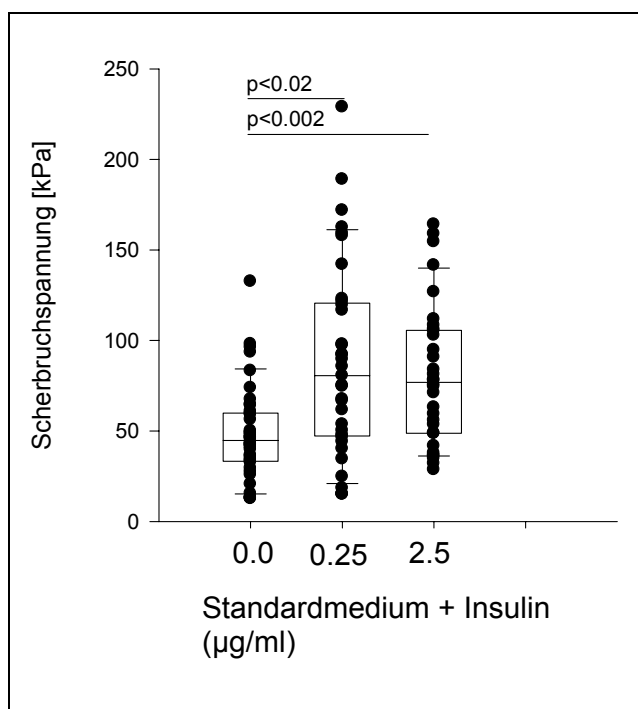
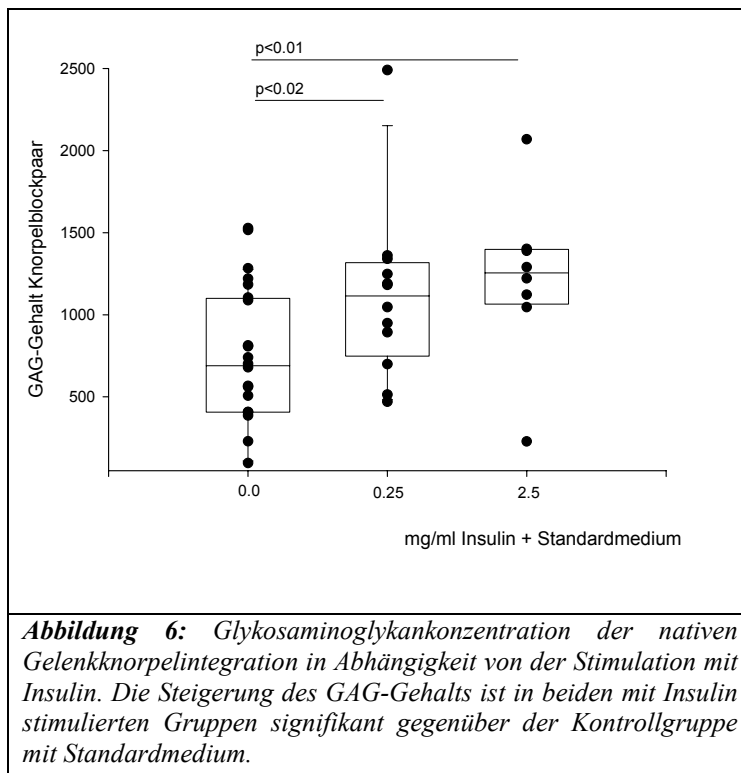


Abbildung 6: Es wird die Integrationssteigerung der nativen Gelenkknorpelblöcke in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration gezeigt. Die Stimulation mit Insulin beider Konzentrationen bewirkte jeweils eine signifikante Integrationssteigerung gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium.

5.2.2 Befunde der Glykosaminoglykan- und DNA Analyse

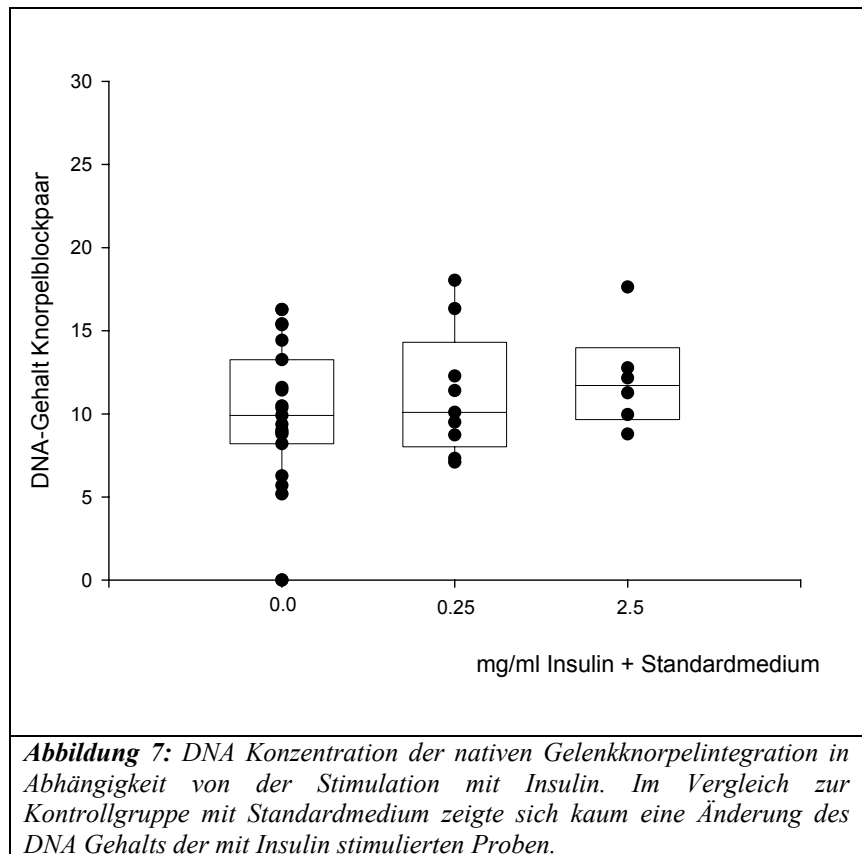
Hier wurde die Glykosaminoglykankonzentration der *nativen* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin der Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Es zeigt sich, dass durch die Substitution von Insulin 0,25 µg/ml eine signifikante (p-Wert < 0,02) Steigerung der



Extrazellulärmatrix in den Knorpelblöcken nach 28 Tagen Kultivierung von einem Median von 717 µg/ml auf einen Median von 1114 µg/ml erfolgte.

Bei einer Insulinkonzentration von 2,5 µg/ml konnte die Glykosaminoglykankonzentration gegenüber der Kontrollgruppe signifikant (p-Wert < 0,01) auf einen Median von 1220 µg/ml gesteigert werden. Zwischen den beiden Insulinkonzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml besteht kein signifikanter Unterschied.

Diese Abbildung zeigt die DNA Konzentration der *nativen* Gelenkknorpelintegration in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin der Konzentrationen 0,25µg/ml und 2,5µg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium. Bei beiden Insulinkonzentrationen zeigt sich jeweils



im Median kaum einen Unterschied der DNA Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe.

5.2.3 Histologische Untersuchung der mit Insulin stimulierten Gewebekultur

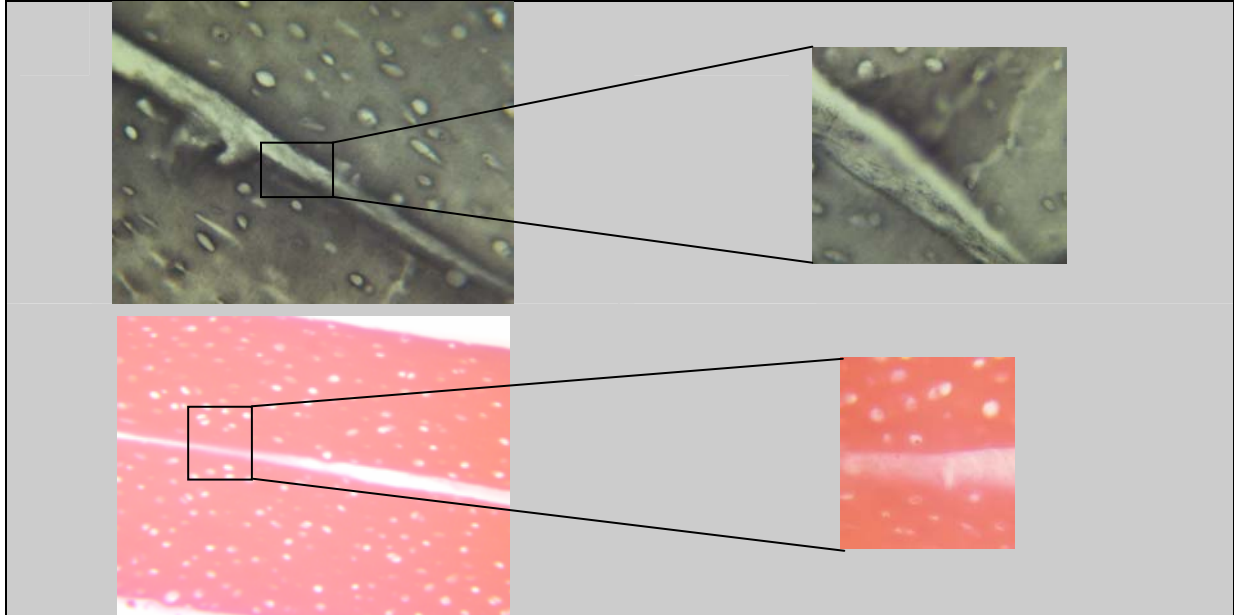


Abbildung 8: Lichtmikroskopische, histologisch gefärbte Aufnahmen in 10facher und 25facher Vergrößerung der mit Insulin stimulierten nativen Gelenkknorpelintegration. Es wird ein Ausschnitt der Integrationszone der beiden Knorpelblöcke dargestellt.

In diesen lichtmikroskopischen Aufnahmen mit einer 10fachen bzw. 25fachen Vergrößerung wurde Kollagen Typ I und II sowie die Extrazellulärmatrix angefärbt.

In den beiden oberen Aufnahmen sieht man Kollagen Typ II angefärbt. Die Quervernetzung der beiden *nativen* Knorpelstücke über den gesamten Integrationsspalt zeigt sich deutlich. Auf den beiden unteren lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde mit Picro-Sirius-Rot (PSR) gefärbt. Dabei kommt die Vernetzung der beiden Gelenkknorpelblöcke ebenfalls deutlich heraus.

5.3 Stimulation der Gelenkknorpelintegration durch Testosteron und in Abhängigkeit von der Kulturdauer

5.3.1 Einfluss des Steroidhormons und der Kultivierungsdauer auf die Gelenkknorpelintegration

In dieser Abbildung wird die Integration *nativen* Gelenkknorpels in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer 14 und 28 Tage und in Abhängigkeit von der Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l dargestellt.

Innerhalb der Kontrollgruppe bewirkte die Verdopplung der Kultivierungsspanne von 14 auf 28 Tage eine signifikante Integrationssteigerung ($p < 0,001$) von einem Median von 48 kPa auf 127 kPa, also eine Verdopplung des Wertes.

Auch innerhalb der mit

Testosteron 10^{-8} mol/l stimulierten Probenreihe bewirkte die Verdopplung der Kultivierungsdauer eine signifikante Steigerung ($p < 0,001$) der Integration. Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe mit Standardmedium und der mit Testosteron 10^{-8} mol/l stimulierten Gruppe ergibt sich im 14 Tage Versuch eine Steigerung der Integrationsleistung von einem Median von 48 kPa auf 94 kPa. Dies entspricht nahezu einer Verdopplung, was mit einem $p < 0,01$ signifikant ist.

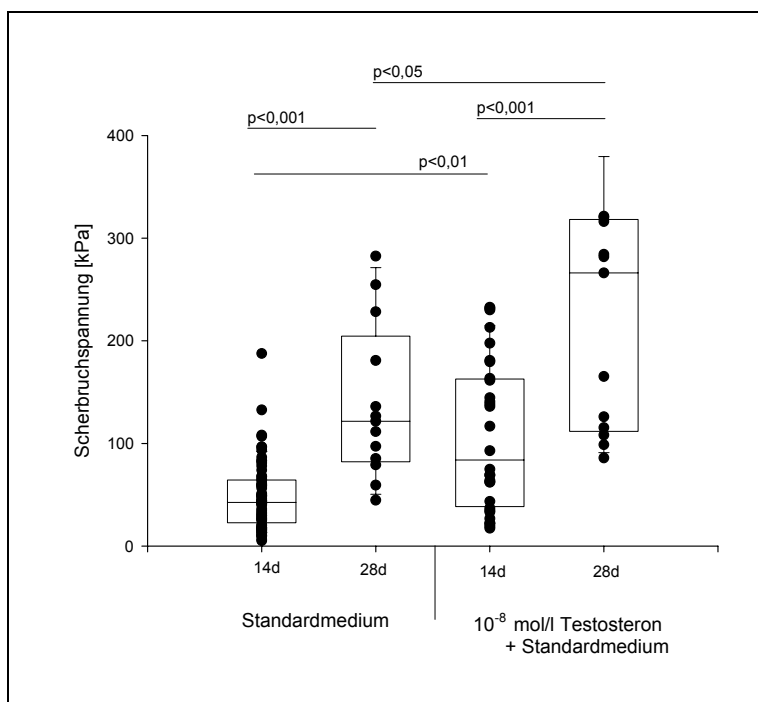


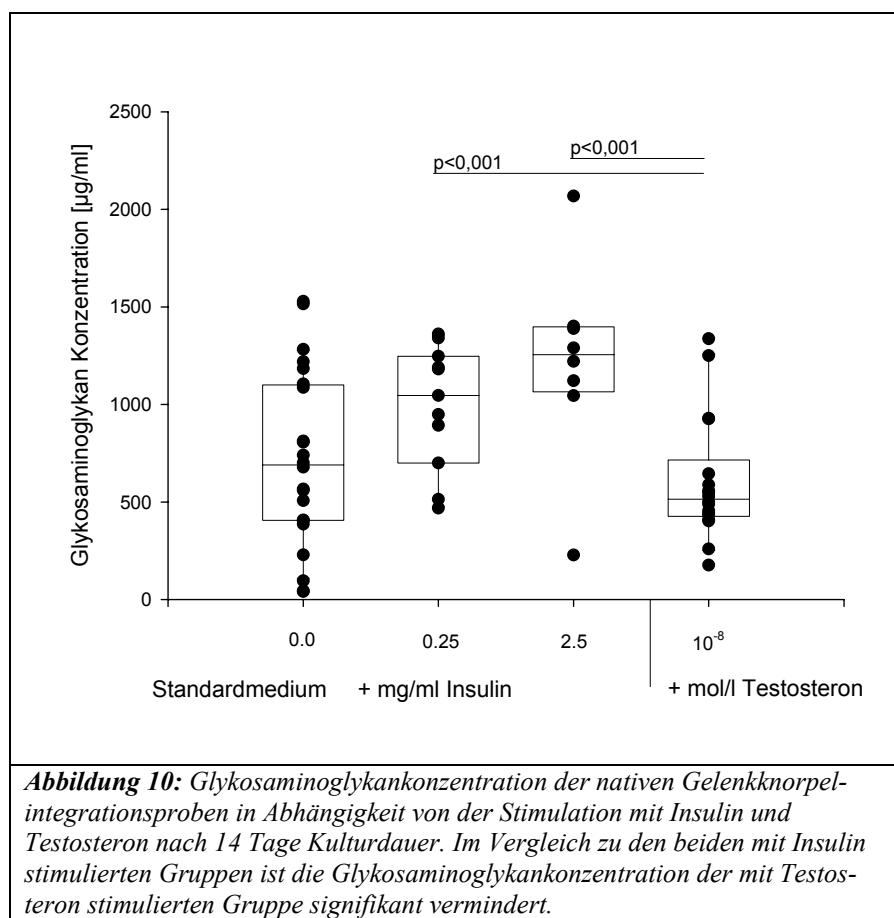
Abbildung 9: Mechanische Integration in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und von der Steroidhormonstimulation. Die Kultivierungsdauer von 14 und 28 Tagen hat sowohl für die Bedingung Standardmedium als auch unter Stimulation mit 10^{-8} mol/l Testosteron mit Standardmedium einen signifikanten Effekt auf die mechanische Integration der Knorpelblöcke. Der Einfluss von Testosteron ist über die Zeit konstant signifikant im Vergleich zum Standardmedium.

Die Steigerung der Integrationskraft innerhalb der 28 Tage Kulturdauer von einem Median von 156 kPa der Kontrollgruppe auf einen Median von 274 kPa bei der mit Testosteron 10^{-8} mol/l stimulierten Gruppe ist ebenfalls signifikant ($p < 0,05$).

5.3.2 Befunde der Glykosaminoglykan- und DNA Analyse

Hier ist die gesamte Glykosaminoglykan-konzentration eines jeweiligen Proben-paares bei Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l im Vergleich zu Insulin $0,25\mu\text{g/ml}$, Insulin $2,5\mu\text{g/ml}$ und zur Kontrollgruppe dargestellt.

Wie schon oben beschrieben, zeigten

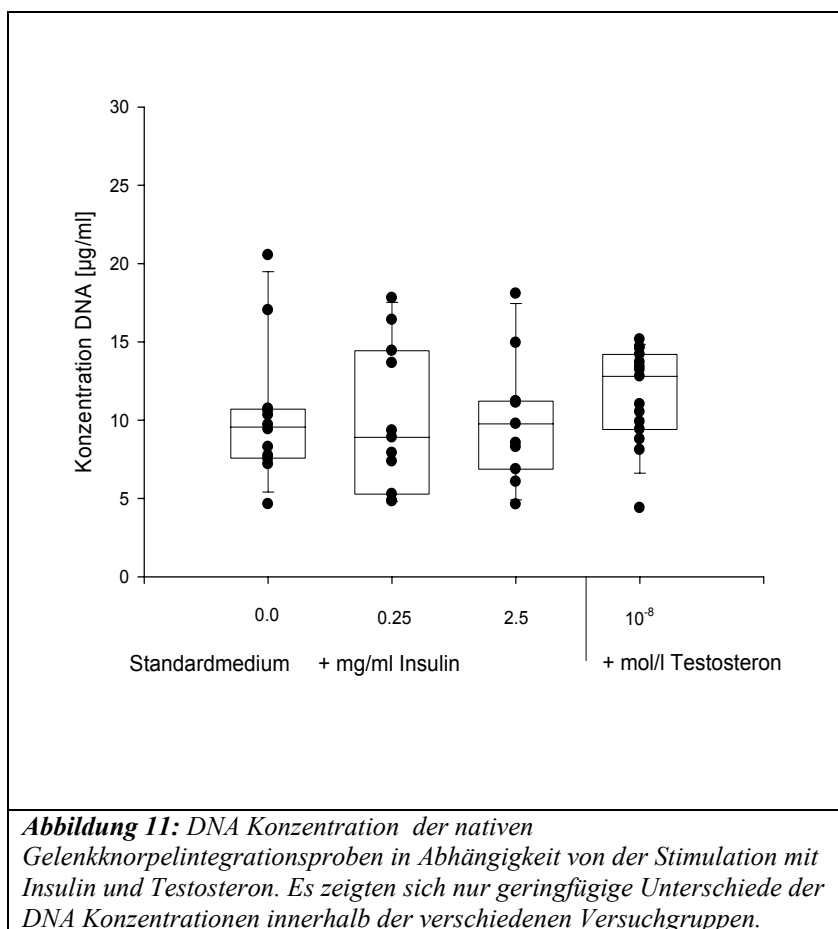


die beiden mit Insulin $0,25\mu\text{g/ml}$ und Insulin $2,5\mu\text{g/ml}$ stimulierten Versuchsreihen eine vermehrte Glykosaminoglykankonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 6).

Bei der Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l dagegen kam es zu einer nicht signifikanten Verminderung der Glykosaminoglykankonzentration mit einem Median von $521\mu\text{g/ml}$ gegenüber der Kontrollgruppe.

Der Unterschied der maximalen Glykosaminoglykankonzentration bei Stimulation mit Insulin 2,5 µg/ml (1370 µg/ml) und dem Minimum (521 µg/ml) bei Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l ist mit einem p-Wert < 0,001 ebenso signifikant, wie der Unterschied der Testosteron Gruppe zu Insulin 0,25 µg/ml ($p < 0,001$).

Hier wird die gesamte DNA Konzentration eines jeweiligen Probenpaares bei Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l im Vergleich zu Insulin 0,25 µg/ml, Insulin 2,5 µg/ml und zur Kontrollgruppe mit Standardmedium gezeigt. Wie unter 5.2.2 beschrieben, gab es bei den Versuchen mit nativem Gelenkknorpel und der



Stimulation mit Insulin kaum Unterschiede des DNA-Gehalts im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium.

Auch die Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l erbrachte so gut wie keine Veränderung des Medians des DNA-Gehalts gegenüber der Kontrollgruppe.

5.3.3 Histologische Untersuchung der mit Testosteron stimulierten Gewebekultur

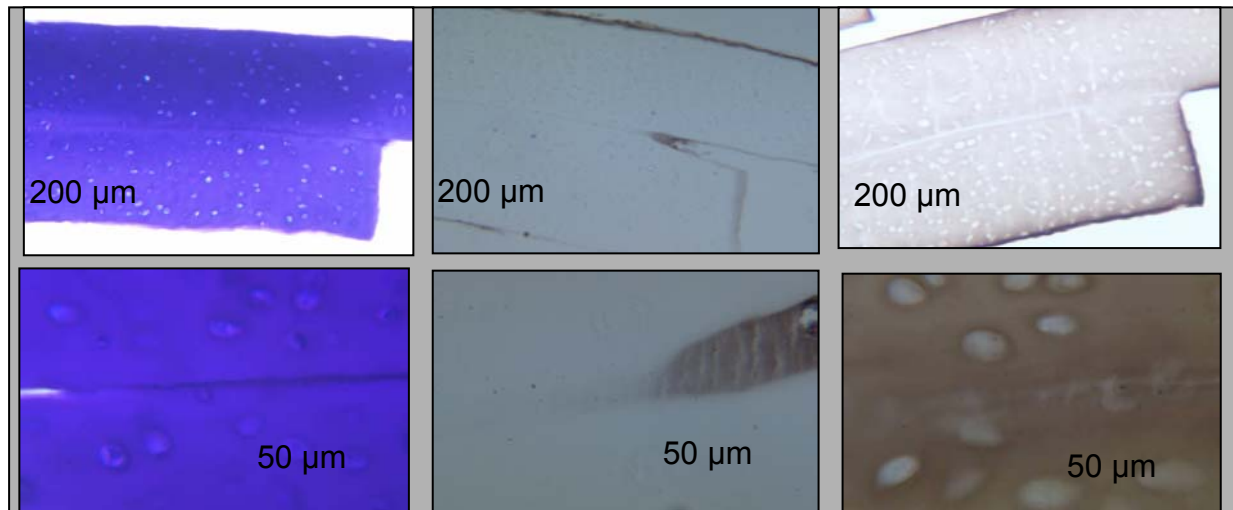


Abbildung 12: Lichtmikroskopische, histologisch gefärbte Aufnahmen der testosteronabhängigen Gelenkknorpelintegration. . Es wird ein Ausschnitt der Integrationszone der beiden Knorpelblöcke dargestellt.

links: Toluidine blau

mitte: Kollagen Typ I (IgG)

rechts: Kollagen Typ II (IgG)

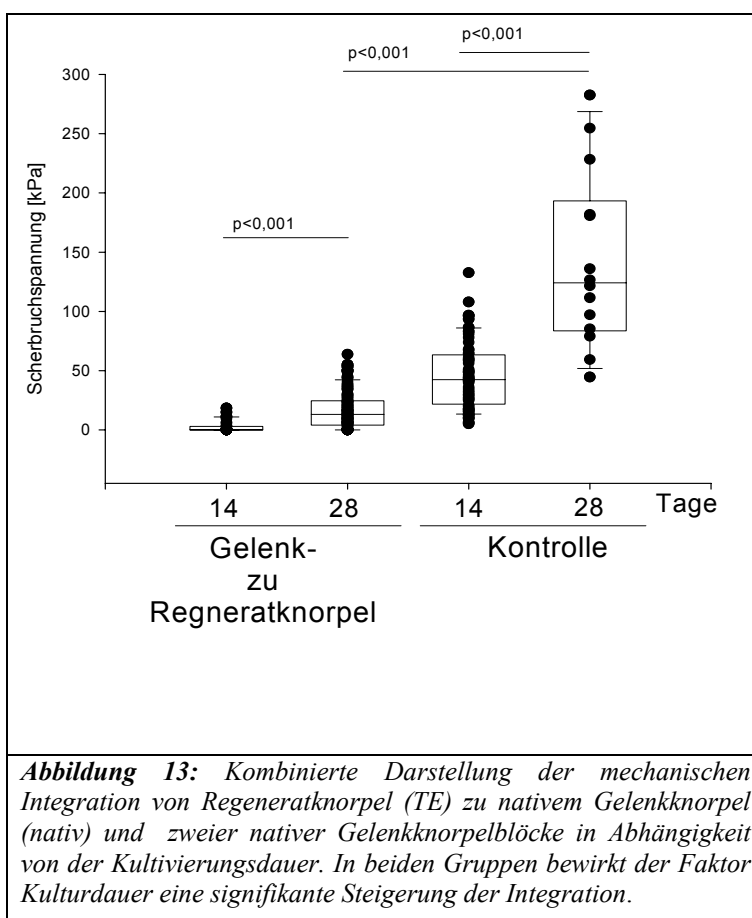
In den mit Testosteron kultivierten Proben kann man die beiden Gelenkknorpelscheiben kaum noch voneinander unterscheiden. Dies deutet auf eine sehr gute Gelenkknorpelintegration hin. Im mittleren Bild ist deutlich das Einwachsen von Kollagen Typ I von einem Gelenkknorpelblock zum anderen über den Integrationsspalt zu erkennen. Kollagen Typ II verteilt sich homogen über die Schnittfläche und ist auch an den Kontaktflächen deutlich zu finden.

5.4 Vergleich der oben aufgeführten Daten der Gelenkknorpelintegration zur Integration des Regeneratknorpels zu nativem Gelenkknorpel (in Zusammenarbeit mit W. Stosiek)

5.4.1 Einfluss der Kulturdauer auf die Gelenkknorpelintegration

Hier wird der Einfluss der Kultivierungsdauer von 14 bzw. 28 Tagen unter Standardbedingungen auf die mechanische Integration im Vergleich zwischen Regeneratknorpel und *nativem* Gelenkknorpel gezeigt.

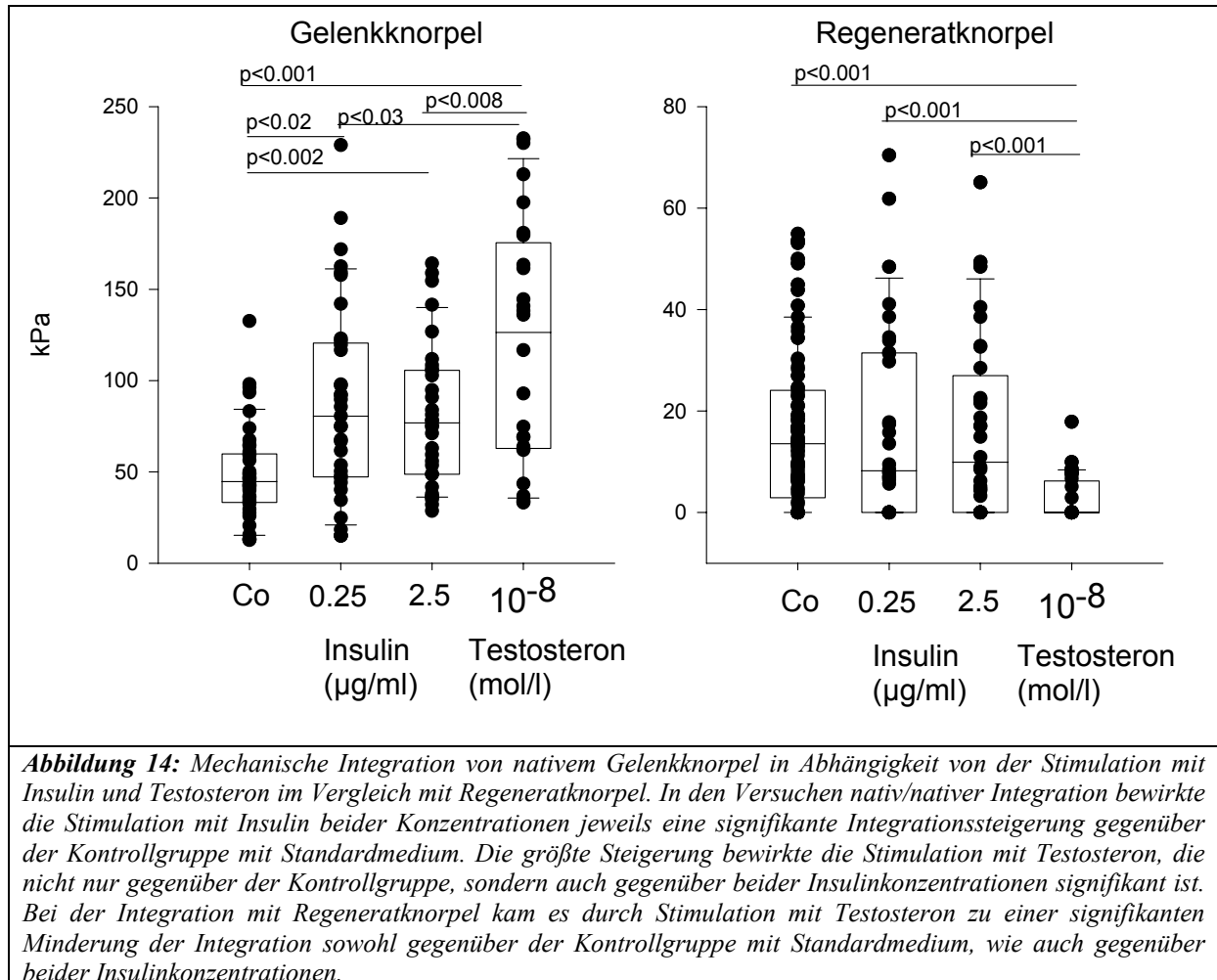
Bei Versuchen mit Regeneratknorpel zeigte sich eine signifikante (p-Wert < 0,001) Zunahme des Medians der Scherbruchspannung bei Ver-



längerung der Kultivierungsdauer von 14 auf 28 Tage von 1,16 kPa auf 18,76 kPa.

Im Vergleich dazu stieg der Mittelwert bei der Integration zweier *nativer* Gelenkknorpelblöcke im gleichen Zeitraum von 48 kPa auf 127 kPa, was mit einem p-Wert < 0,001 ebenfalls signifikant ist.

5.4.2 Einfluss von Insulin und Testosteron auf die Integration von Regeneratknorpel und *nativen* Gelenkknorpelblöcken



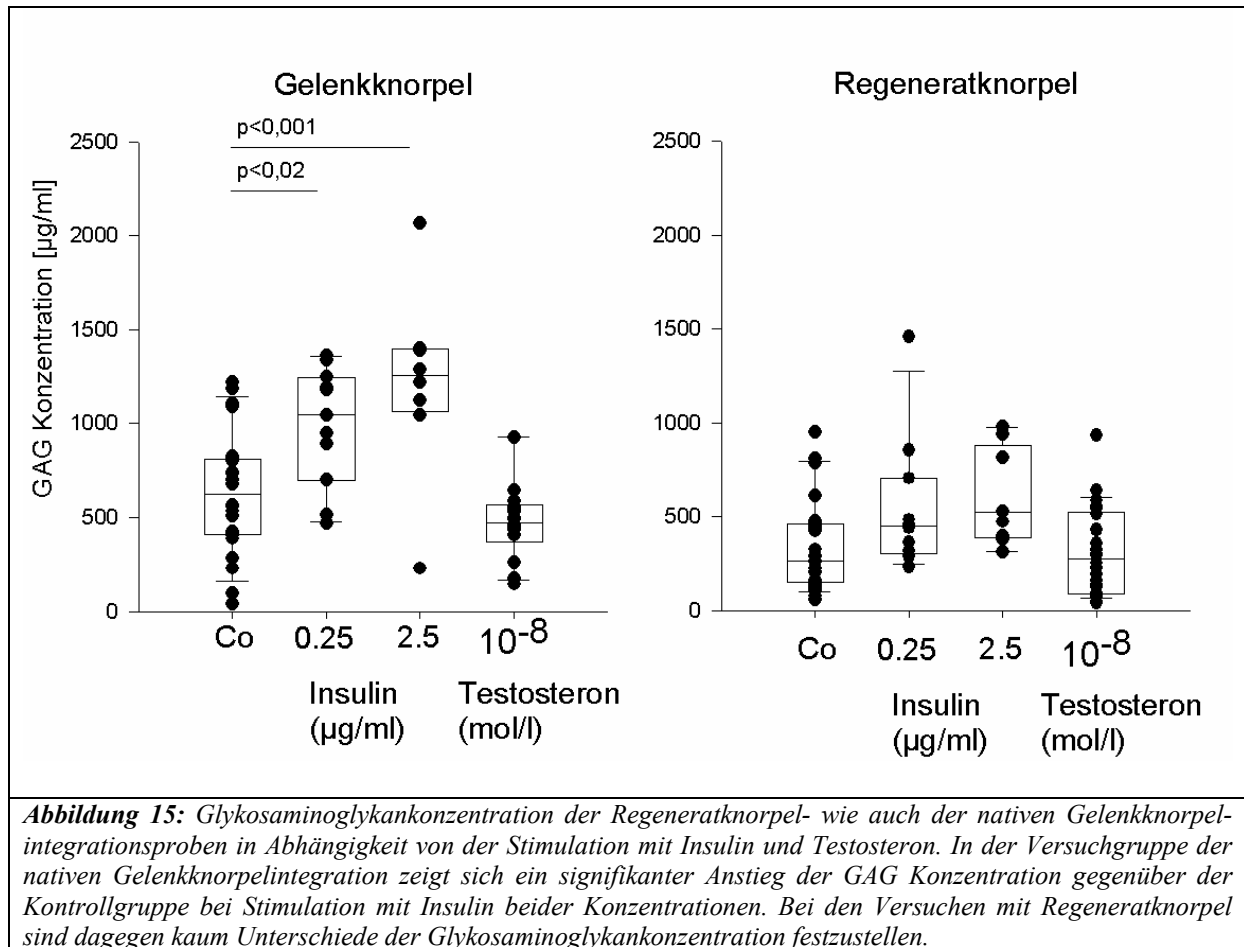
Dargestellt ist die Scherbruchspannung als Maß für die Integration von *nativem* Gelenkknorpel in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin und Testosteron. Insulin wurde in den Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml verwendet, Testosteron mit 10⁻⁸ mol/l. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde durch Stimulation mit Insulin 0,25µg/ml eine signifikante (p<0,02) Integrationssteigerung von einem Median von 48,9 kPa auf 77,8 kPa erreicht. Mit einem p-Wert < 0,002 war die Integrationssteigerung mit Insulin 2,5 µg/ml ebenfalls signifikant.

Den maximalen Wert erreichte die Gruppe mit Testosteron 10^{-8} mol/l, welcher mit 127 kPa signifikant sowohl gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) wie auch gegenüber der Insulinkonzentrationen 0,25 µg/ml ($p < 0,03$) und 2,5 µg/ml ($p < 0,008$) gesteigert war.

Im Vergleich dazu ist die Scherbruchspannung als Maß für die Integration von Regeneratknorpel mit einem *nativen* Gelenkknorpelblock in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin und Testosteron im rechten Diagramm dargestellt. Insulin wurde in den Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml verwendet, Testosteron mit 10^{-8} mol/l. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium wurde durch Stimulation mit Insulin 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml eine nicht signifikante Integrationssteigerung erreicht. Die Regeneratproben rissen jedoch zum Teil im Regeneratgewebe und nicht im Bereich der Überlappungszone. Insgesamt stellte sich durch Stimulation mit Insulin eine Integrationssteigerung dar, welche mit einem p-Wert von 0,07 bei Insulin 0,25 µg/ml und einem p-Wert von 0,1 bei Insulin 2,5 µg/ml tendenziell einen stimulatorischen Effekt des Insulins bedeutet.

In der Versuchsreihe mit Testosteron 10^{-8} mol/l kam es zu einer signifikanten Abnahme der Integrationsleistung sowohl gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,001$), wie auch gegenüber beider Insulinkonzentrationen 0,25 µg/ml ($p < 0,001$) und 2,5 µg/ml ($p < 0,001$).

5.4.3 Befunde der Glykosaminoglykan- und DNA Analyse



Hier ist die gesamte Glykosaminoglykankonzentration eines jeweiligen Probenpaares im Vergleich zwischen Gelenkknorpelregenerat und *nativem* Gelenkknorpel dargestellt. Beide Hauptversuchsgruppen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils mit Insulin 0,25 µg/ml, Insulin 2,5 µg/ml und Testosteron 10⁻⁸ mol/l stimuliert.

Wie schon beschrieben, ist in den Versuchreihen mit *nativem* Gelenkknorpel eine ähnliche Tendenz zu beobachten. Die beiden mit Insulin 0,25 µg/ml und Insulin 2,5 µg/ml stimulierten Versuchsserien zeigten eine vermehrte Glykosaminoglykankonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei war die Steigerung der Konzentration bei Stimulation mit Insulin 0,25 µg/ml auf einen Median von 1114 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe (717 µg/ml) mit

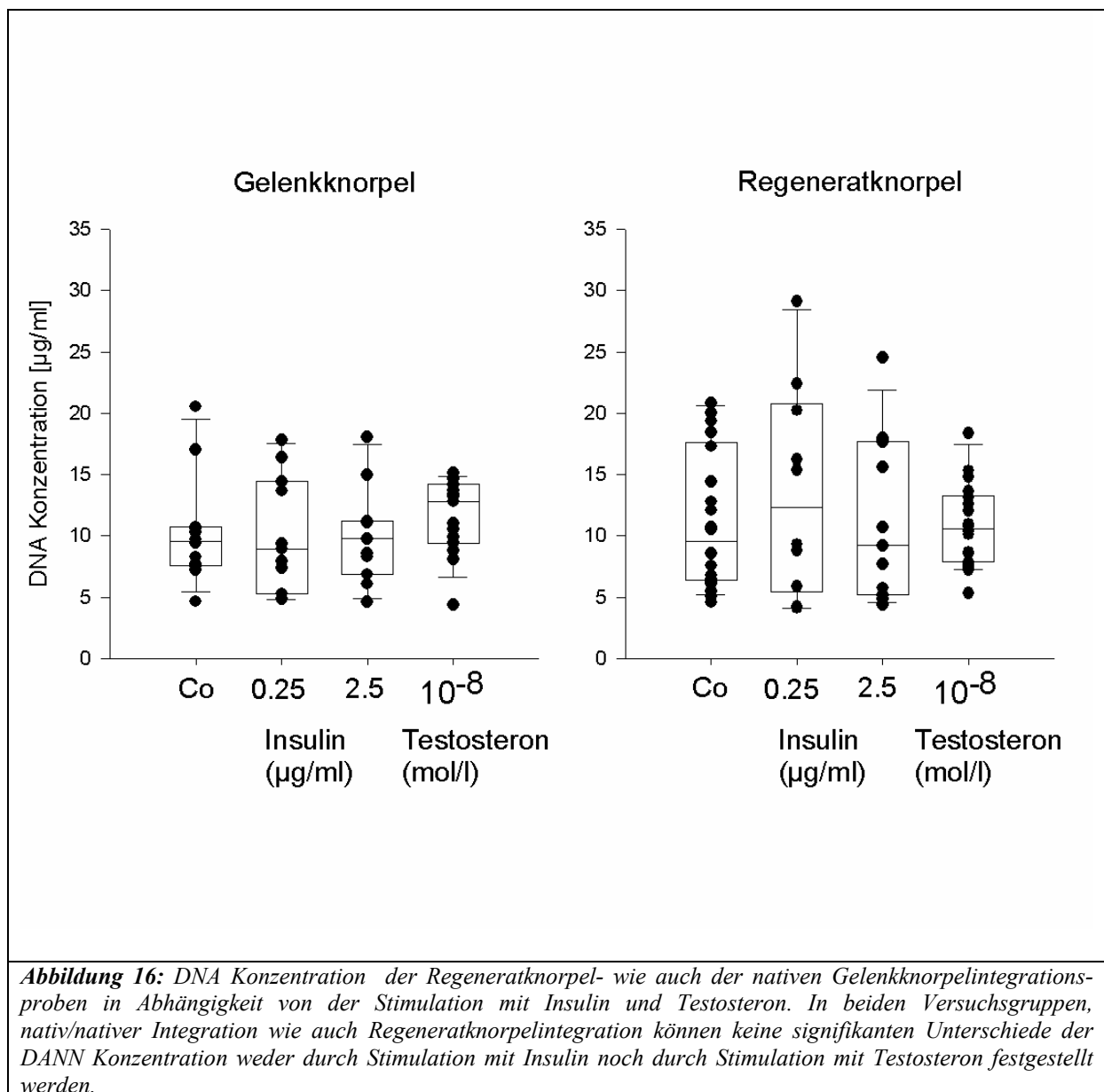
einem $p < 0,02$ signifikant. Auch bei der Stimulation mit Insulin $2,5 \mu\text{g/ml}$ stellte sich eine signifikante ($p < 0,001$) Konzentrationserhöhung auf einen Median von $1220 \mu\text{g/ml}$ gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium dar.

Bei der Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l dagegen kam es zu einer nicht signifikanten Verminderung der gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Glykosaminoglykankonzentrationen innerhalb beider Insulinkonzentrationen unterscheiden sich kaum.

Innerhalb der Versuchreihen mit Gelenkknorpelregeneraten zeigte sich bei Stimulation mit Insulin ein Anstieg des Medians der Glykosaminoglykankonzentration gegenüber der Kontrollgruppe. Während bei Zugabe von Insulin $0,25 \mu\text{g/ml}$ eine Steigerung des Medians der Konzentration von $388 \mu\text{g/ml}$ auf $490 \mu\text{g/ml}$ zu sehen war, zeigte sich bei Stimulation mit Insulin $2,5 \mu\text{g/ml}$ ein Anstieg auf einen Median von $550 \mu\text{g/ml}$.

Die Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l dagegen führte bei den Versuchen mit Regeneratknorpel zu kaum einer Veränderung der Glykosaminoglykankonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium.



Dargestellt ist die gesamte DNA-Konzentration eines jeweiligen Probenpaares im Vergleich zwischen *nativem* Gelenkknorpel und Gelenkknorpelregenerat. Beide Hauptversuchsgruppen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils mit Insulin 0,25 µg/ml, Insulin 2,5 µg/ml und Testosteron 10⁻⁸ mol/l stimuliert.

Wie in vorangegangenen Kapiteln schon beschrieben, zeigte sich in der Gruppe mit *nativem* Gelenkknorpel bei Stimulation mit Insulin kaum eine Änderung der DNA-Konzentration im

Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l dagegen erbrachte eine geringe Steigerung des Medians der DNA-Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe.

In den Versuchsreihen mit Regeneratknorpel ließen sich keine signifikanten Veränderungen zeigen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe brachte die Stimulation mit Insulin 0,25 µg/ml einen leichten Anstieg des Medians der DNA-Konzentration von 8,98 µg/ml auf 11,3 µg/ml. Bei Zugabe von Insulin 2,5 µg/ml blieb der Median mit 9,2 µg/ml fast unverändert.

In der Versuchsreihe mit Testosteron 10^{-8} mol/l stieg der Median der DNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht an.

5.4.4 Histologische Untersuchung der Gewebepaare und der Integrationszone

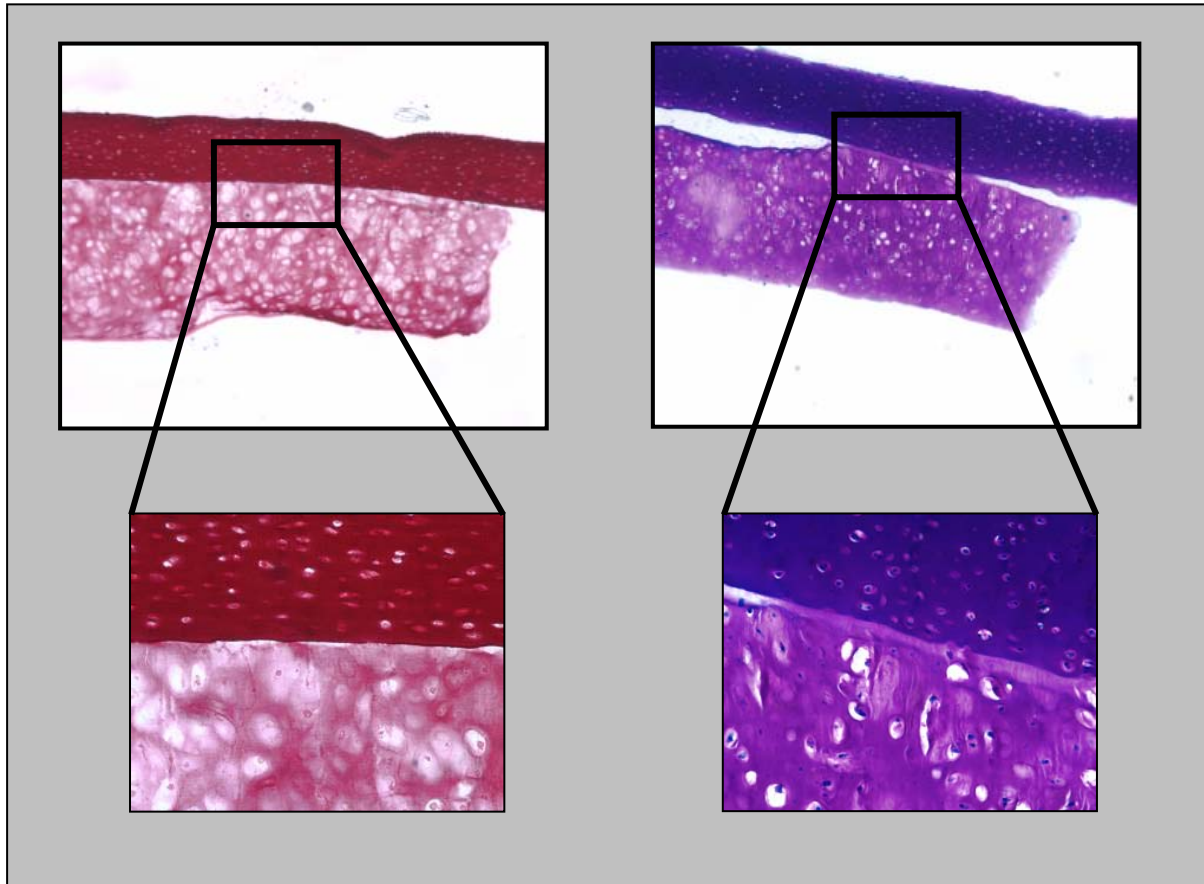


Abbildung 17: Lichtmikroskopische, histologisch gefärbte Aufnahmen der Gelenkknorpelintegration von nativem Gelenkknorpel mit Regeneratknorpel.

links: Safranin O Färbung mit Vergrößerung der Integrationszone (unten)
native Knorpelscheibe oben / TE – Konstrukt unten

rechts: DMMB Färbung mit Vergrößerung Integrationszone (unten)
native Knorpelscheibe oben / TE – Konstrukt unten

Es handelt sich um zwei lichtmikroskopische Aufnahmen mit einer 10fachen bzw. 25fachen Vergrößerung. Die beiden Aufnahmen stammen aus einem Integrationsversuch von einem Regeneratknorpelblock mit einem *nativen* Gelenkknorpelblock.

Bei den Regeneratknorpelblöcken (der jeweils untere Knorpelblock) ist deutlich die aufgelockerte Struktur des Knorpels im Vergleich zum *nativen* Gelenkknorpel (oben) zu erkennen. Der *native* Knorpel zeigt eine wesentlich feinere Zellstruktur auf. Die

Quervernetzung der Knorpelblöcke in der Überlappungszone wird fast über die ganze Länge deutlich sichtbar. Sowohl Kollagen Typ I als auch Kollagen Typ II sind an der Integration beteiligt.

6 Diskussion

6.1 Validierung des Versuchsmodells

Untersuchungen zur besseren Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen mit dem angewendeten Modell nach Reindel führten zu verschiedenen Modifikationen des publizierten Modells[10]. Von unserer Forschungsgruppe selbstangefertigte Schnittwerkzeuge konnten eine sichere standardisierte Geometrie der biologischen Versuchskörper garantieren. Die mechanische Integration zweier Gelenkknorpel ist bekanntermaßen von den lebenden Zellen, der zellsynthetischen Leistung, insbesondere des Kollagenstoffwechsels, abhängig [7,8,10]. Die Zeit von der Schlachtung bis zur Verarbeitung des Gewebes und die Behandlung des Gewebes in Bezug auf Kühlung und Lagerung haben einen starken Einfluss auf die Vitalität des zu präparierenden Gewebes. Es zeigte sich in Vorversuchen von Julia Kaiser, dass der Abschluss der Gewebepräparation innerhalb von 24h nach Schlachtung und die Kontrolle des Gewebes durch einen Life/Dead-Kit zu deutlich aussagekräftigeren Werten führten. Daher wurde vor jeder Versuchsreihe ein Life/Dead-Kit durchgeführt. Schwankungen in der Geometrie wie auch Vitalität der Gelenkknorpelblöcke haben einen massiven Einfluss, sowohl auf die mechanische Integration als auch auf die biochemische Analytik. Unterschiede durch die Stimulation mit Botenstoffen könnten durch diese sekundären Einflüsse in den Versuchsergebnisse untergehen. Deshalb war die Standardisierung des Modells nach Reindel ein wesentlicher Bestandteil zur erfolgreichen Etablierung des Modells in Regensburg.

Untersuchungen zur Schichtdicke der Knorpelproben waren notwendig geworden, da eine modifizierte Kulturkammer mit der Möglichkeit der Kompression der Kontaktfläche zum bekannten Modell nach Reindel eingesetzt werden sollte. Aus Voruntersuchungen von Herrn Reindel war der Einfluss der Schichtdicke und etwaiger Stempel auf den Prüfkörpern auf die in vitro Integration bekannt. Die Integration war in einem Bereich von 250 bis 350µm nicht unterschiedlich. In dieser Untersuchung konnte sichergestellt werden, dass Proben mit einer

Schichtdicke von 250 bis 350µm mit dem modifizierten arretierbaren Stempel und Standardmedium eine sehr gut reproduzierbare mechanische Integration von 50kPa +/- 2,9kPa erzeugt. Eine Abnahme der Integration war erst ab einer Schichtdicke von 500 µm zu vermuten. Dies liegt wahrscheinlich an der mangelnden Diffusionskraft und somit der Minderversorgung des gesamten Knorpelblocks über die Kultivierungsdauer. Diese Schritte machten die folgenden vergleichenden Untersuchungen möglich.

6.2 Einfluss des Botenstoffes Insulin auf die Gelenkknorpelintegration

Immer wieder wird wie oben erwähnt ein positiver Einfluss von insulin-like growth factor (IGF-1) auf Knorpelzellen und deren Wachstum und Ausprägung beschrieben. Insulin greift genauso wie IGF-1 am IGF-1 Rezeptor an und hat laut K. Kellner [10] äquivalente Effekte. Bei der Kultivierung von Gelenkknorpelregeneraten stellte sich ebenfalls ein positiver Effekt von Insulin auf die mechanischen Eigenschaften wie die Stabilität des Knorpelregenerats dar. Da unsere Versuchsreihen den Vergleich *nativer* Gelenkknorpelintegration mit der Regeneratknorpelintegration zum Ziel hatten, wurde in einem Vorversuch der Einfluss von Insulin verschiedener Konzentrationen getestet.

Dabei zeigte sich bei zunächst niedriger Probenzahl im Scherbruchversuch die Tendenz zur Integrationssteigerung in allen Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe Standardmedium. Die größte Steigerung der Integration konnte bei Stimulation mit Insulin der Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml beobachtet werden. Da aus Vorversuchen parallel Regeneratknorpel mit Insulin der Konzentrationen 0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml gezüchtet wurde, wurden die äquivalenten Konzentrationen des Botenstoffs für die weiteren Versuche verwendet.

In den weiteren Versuchen bestätigte sich die Tendenz der Vorversuche. Bei höherer Probenzahl erwies sich die Steigerung der Integrationsleistung im Scherbruchversuch bei

beiden Insulinkonzentrationen (0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml) als signifikant gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium.

Bei der biochemischen Bestimmung der Glykosaminoglykankonzentration in Abhängigkeit von der Stimulation mit Insulin der Konzentrationen 0,25µg/ml und 2,5µg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei beiden Insulinkonzentrationen eine signifikante Steigerung der Produktion von Extrazellulärmatrix. Der Gehalt an DNA der Proben veränderte sich bei Stimulation mit beiden Insulinkonzentrationen kaum.

In der Zusammenschau der Befunde kann gesagt werden, dass Insulin die Neusynthese von extrazellulärer Matrix und Kollagen in den Knorpelzellen stärker fördert als die Zellproliferation. Damit lässt sich zum Einen die Erhöhung des Glykosaminoglykan Gehalts erklären, zum Anderen die nur geringen Veränderungen des Gehalts an DNA.

6.3 Einfluss des Botenstoffes Testosteron auf die Gelenkknorpelintegration

Es ist bekannt, dass Testosteron eine dosisabhängige Steigerung der Gelenkknorpelintegration vor allem bei einer Testosteronkonzentration von 10^{-8} mol/l bewirkt [19]. In den Versuchen konnte die signifikante Steigerung der Gelenkknorpelintegration mit einer Testosteronkonzentration von 10^{-8} mol/l jederzeit wiederholt werden. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass auch durch Prolongation der Kultivierungsdauer eine Testosteronkonzentration von 10^{-8} mol/l weiterhin signifikant stimulierend wirksam ist. Das bedeutet, dass eine längere Kontaktzeit mit Testosteron keineswegs einen schädlichen Effekt auf die Vitalität des Gewebes hat und das Versuchsmodell auch über 4 Wochen zu funktionieren scheint. Der nicht ganz lineare Verlauf des Integrationsanstiegs ist möglicherweise damit zu erklären, dass die gleiche Anzahl an neu gebildeten Kollagenfasern und auch an extrazellulärer Matrix in den zusätzlichen 14 Tagen erneut gebildet werden,

zusätzlich aber die schon in den ersten 14 Tagen gebildeten Quervernetzungen so stabil sind, so dass sie sich noch weiter verfestigen und stärker in den Knorpelblock zu integrieren.

Der Gehalt an Glykosaminoglykan der Proben hat sich gegenüber der Kontrollgruppe nicht wesentlich verändert. Entgegen des beschriebenen antiproliferativen, Apoptose-fördernden Effekts von Testosteron war in den Versuchen kaum eine Veränderung des DNA Gehalts der Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen. Dabei ist der DNA Gehalt als Maß für die Zellzahl des Knorpels zu werten. Das heißt, bei gleich bleibender oder leicht verminderter Zellzahl wird die Integrationskraft gesteigert und vermutlich vermehrt Kollagen produziert. Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich auf die Unterschiede in der Zelldifferenzierung zwischen Zellproliferation und Erhöhung der Syntheseleistung zurückführen. Es ist wahrscheinlich, dass Testosteron vermehrt die Syntheseleistung in der einzelnen Zelle fördert und somit die Produktion extrazellulärer Matrix und von Kollagen verstärkt. Die Zellteilung wird jedoch nicht weiter vorangetrieben.

In den histologischen Schnittbildern wie auch in den elektronenmikroskopischen Abbildungen ist das Einwachsen von Kollagenfasern über den Integrationsspalt in den gegenüberliegenden Gelenkknorpelblock deutlich zu sehen.

6.4 Vergleich des Einflusses von Insulin und Testosteron auf die Integration von Gelenkknorpel und Regeneratknorpel

Im Vergleich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten der *nativen* Gelenkknorpelintegration hat Herr Stosiek sich parallel mit der Integration von Regeneratknorpel zu *nativem* Knorpel befasst.

Bei der Stimulation des *nativen* Knorpels mit Insulin zeigten sich die oben beschriebenen Veränderungen. Die Integrationsleistung im Scherbruchversuch bei beiden Insulinkonzentrationen (0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml) steigerte sich signifikant gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei beiden

Insulinkonzentrationen eine signifikante Steigerung der Produktion von Extrazellulärmatrix.

Der Gehalt an DNA der Proben veränderte sich bei beiden Insulinkonzentrationen kaum.

Bei Stimulation des Regeneratknorpels mit Insulin in den selben Konzentrationen wie bei Versuchen mit *nativem* Knorpel (0,25 µg/ml und 2,5 µg/ml) kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium wurde durch Stimulation mit Insulin eine Integrationssteigerung erreicht.

Bezüglich der DNA-Konzentration bei Zugabe von Insulin blieb auch diese, ähnlich dem *nativen* Knorpelgewebe, nahezu unverändert, eher leicht vermindert.

Bezüglich der Glykosaminoglykankonzentration bei Stimulation mit Insulin gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium zeigte sich auch hier wie bei *nativem* Gelenkknorpel eine Steigerung, die mit einer Vermehrung der extrazellulären Matrix einhergeht.

Zu beachten ist, dass die beiden Gewebearten zwar gleichförmig auf die Stimulation reagieren, jedoch auf einem unterschiedlichen Niveau. Die Integrationsleistungen des nativen Gewebes sind um den Faktor 5-10 höher.

Dennoch zeigt sich, dass sich die schon beschriebenen positiven Effekte von Insulin auf die Regeneratknorpelzüchtung auch auf die Integration übertragen lassen. Anscheinend ist die Ausprägung von Insulin-sensitiven Rezeptoren und deren Ansprechen mit anschließender Effektkaskade in beiden Gewebearten ähnlich vorhanden. Dies bedeutet, dass bei weiteren Versuchen oder eventuellen *in vivo* Studien Regeneratknorpel und *nativer* Knorpel hinsichtlich des Einsatzes von Insulin gleich zu behandeln sind.

Ganz anders verhält es sich dagegen beim Vergleich der Stimulation der Integration beider Gewebearten mit Testosteron. Wie schon oben dargestellt, konnte bei der *nativen* Gelenkknorpelintegration die absolut höchste Integrationssteigerung gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardmedium bei Stimulation mit Testosteron 10^{-8} mol/l erreicht werden. Der Gehalt an Glykosaminoglykan der Proben hat sich gegenüber der Kontrollgruppe genau wie der DNA Gehalt der Proben nicht wesentlich verändert.

Bei Stimulation der Regeneratknorpelintegration mit Testosteron kommt es dagegen zu einer signifikanten Abnahme der Integrationsleistung, sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber beider verwendeter Insulinkonzentrationen.

Dafür stieg der Median der DNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht an und die Glykosaminoglykankonzentration nahm leicht ab.

Es bleibt festzuhalten, dass zum ersten Mal dieser gegensätzliche Effekt von Testosteron auf *nativen* Gelenkknorpel und Regeneratknorpel dargestellt wurde. Steroidhormone werden lokal von Zellen metabolisiert und von Entzündungsreaktionen beeinflusst. Eine wichtige Reaktion wird durch Aromatase vermittelt, die aktives Testosteron in inaktive Metabolite umwandelt [18]. Sollte die Aromatase im Regeneratknorpel vermehrt ausgeprägt sein oder werden und somit vermehrt Testosteron deaktivieren, könnte dies die unterschiedlichen Wirkungen erklären. Zudem wird die zeitweise Umwandlung von Testosteron in die aktivere Form Dihydrotestosteron diskutiert [56]. Auch hier könnte eine unterschiedliche Ausprägung der entsprechenden Enzyme für die unterschiedliche Reaktion verantwortlich sein.

Eine weitere Möglichkeit dieses Effekts ist z. B. die unterschiedliche Ausprägung von Rezeptoren, die die Wirkung von Testosteron vermindern oder verstärken. Zudem wird in der Literatur ein Einfluss von Testosteron auf den IGF-1 Rezeptor diskutiert [57,58]. Das kann bedeuten, dass Testosteron die positive Wirkung von Insulin, das bei der Anzucht des Regeneratknorpels weitestgehend genutzt wurde, wieder aufhebt und die Integration nicht gesteigert wird, weil sich die Qualität des Regeneratknorpels verschlechtert.

Um diese neuen Erkenntnisse *in vivo* nutzen zu können, sollte in weiteren Versuchen die genaue Ursache des unterschiedlichen Effekts in den beiden Geweben geklärt werden.

7 Zusammenfassung

Diese Studie demonstriert, dass durch eine Validierung und Standardisierung eines experimentellen *in vitro* Modells Untersuchungen zur Stimulation und Integration von Regeneratknorpelgewebe möglich wurden. Es konnte der Nachweis geführt werden, dass Regeneratknorpelgewebe ähnlich auf die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor Insulin reagiert wie *nativer* Gelenkknorpel. Dagegen besteht ein hoch signifikanter Unterschied beider Gewebearten auf die Stimulation mit Testosteron.

Gelenkknorpelgewebe kann unter Standardkulturbedingungen zusammenwachsen. In den hier standardisierten Bedingungen entwickelt sich in einem Scherbruchversuch eine durchschnittliche mechanische Integration von 50kPa. Wird dem Standardmedium 0,25µg/ml bzw. 2,5 µg/ml Insulin oder 10^{-8} mol/l Testosteron zugefügt, so steigert sich, signifikant zur Kontrolle Standardmedium, die mechanische Integration für *nativen* Gelenkknorpel. Die Gewebezusammensetzung veränderte sich. Der DNA-Gehalt wurde durch Zugabe von Insulin oder Testosteron im Vergleich zum Standardmedium kaum verändert. Dafür bildete sich im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Standardmedium durch Zugabe von Insulin beider Konzentrationen signifikant mehr extrazelluläre Matrix, was sich im Anstieg der Glykosaminoglykankonzentration zeigte. Dieser Einfluss des Steroidhormons war auch in einer prolongierten Kulturdauer konstant.

Werden die gleichen Kulturbedingungen auf Regeneratknorpelgewebe angewendet, so zeigt sich ein ähnlicher stimulierender Effekt für Insulin auf die mechanische Integration. Diese fällt dagegen durch die Gabe von Testosteron signifikant ab.

Diese Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, dass es einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der mechanischen Integration von Regeneratknorpelgewebe und *nativem* Gelenkknorpelgewebe unter Kulturbedingungen gibt. Die Stimulation durch den

Wachstumsfaktor Insulin erfolgt über den IGF-1 Rezeptor und zeigt sich ähnlich bei *nativem* Knorpelgewebe und Regeneratknorpel.

Das Steroidhormon Testosteron dagegen muss zunächst in seine aktivere Form Dihydrotestosteron umgewandelt und später über eine Aromatase zu unwirksamen Metaboliten abgebaut werden. Es ist anzunehmen, dass unter den gewählten Kulturbedingungen diese Wege im Vergleich von *nativem* Gelenkknorpel mit Regeneratknorpel unterschiedlich stark stimuliert werden und es somit zu diesem gegensätzlichen Effekt kommt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, weshalb genau der hier dargestellte Effekt der Botenstoffe Insulin und Testosteron auf die beiden Gewebearten entsteht.

8 Literatur

1. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM: **Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study.** *J Bone Joint Surg Am* 2001, **83-A**: 53-64.
2. Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM: **Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options.** *J Am Acad Orthop Surg* 2001, **9**: 37-52.
3. Hunter CJ, Levenston ME: **Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model.** *Tissue Eng* 2004, **10**: 736-746.
4. Hunziker EB, Rosenberg LC: **Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane.** *J Bone Joint Surg Am* 1996, **78**: 721-733.
5. Scully S: **In-vitro Integration of articular cartilage enhanced by Growth-Factors.**
6. Ahsan T, Lottman LM, Harwood F, Amiel D, Sah RL: **Integrative cartilage repair: inhibition by beta-aminopropionitrile.** *J Orthop Res* 1999, **17**: 850-857.
7. DiMicco MA, Sah RL: **Integrative cartilage repair: adhesive strength is correlated with collagen deposition.** *J Orthop Res* 2001, **19**: 1105-1112.
8. DiMicco MA, Waters SN, Akeson WH, Sah RL: **Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**: 218-225.
9. Giurea A, DiMicco MA, Akeson WH, Sah RL: **Development-associated differences in integrative cartilage repair: roles of biosynthesis and matrix.** *J Orthop Res* 2002, **20**: 1274-1281.
10. Reindel ES, Ayroso AM, Chen AC, Chun DM, Schinagl RM, Sah RL: **Integrative repair of articular cartilage in vitro: adhesive strength of the interface region.** *J Orthop Res* 1995, **13**: 751-760.
11. Allan DA: **Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries.** *Clin Orthop* 1998, 32-38.
12. Lee JH, Fitzgerald JB, DiMicco MA, Grodzinsky AJ: **Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**: 2386-2395.
13. Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K: **Mechanisms of chondrocyte apoptosis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**: 389-391.
14. Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S *et al.*: **Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 1292-1301.

-
15. DiMicco MA, Patwari P, Siparsky PN, Kumar S, Pratta MA, Lark MW *et al.*: **Mechanisms and kinetics of glycosaminoglycan release following in vitro cartilage injury.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**: 840-848.
 16. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B *et al.*: **Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity.** *Lupus* 2004, **13**: 635-638.
 17. Galois L, Freyria AM, Herbage D, Mainard D: **[Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches].** *Pathol Biol (Paris)* 2005, **53**: 590-598.
 18. Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Scholmerich J, Straub RH: **Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**: R938-R948.
 19. Englert C, Blunk T, Fierlbeck J, Kaiser J, Stosiek W, Angele P *et al.*: **Steroid hormones strongly support bovine articular cartilage integration in the absence of interleukin-1beta.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**: 3890-3897.
 20. Brindley DN: **Neuroendocrine regulation and obesity.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992, **16 Suppl 3**: S73-S79.
 21. Unger RH, Dobbs RE, Orci L: **Insulin, glucagon, and somatostatin secretion in the regulation of metabolism.** *Annu Rev Physiol* 1978, **40**: 307-343.
 22. Gutierrez A, Nieto J, Pozo F, Stern S, Schoofs L: **Effect of insulin/IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*.** *Gen Comp Endocrinol* 2007, **153**: 170-175.
 23. Jacobs S, Cuatrecasas P: **Insulin receptor: structure and function.** *Endocr Rev* 1981, **2**: 251-263.
 24. Kahn CR, Baird KL, Flier JS, Grunfeld C, Harmon JT, Harrison LC *et al.*: **Insulin receptors, receptor antibodies, and the mechanism of insulin action.** *Recent Prog Horm Res* 1981, **37**: 477-538.
 25. Rechler MM, Nissley SP: **The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors.** *Annu Rev Physiol* 1985, **47**: 425-442.
 26. Czech MP: **Signal transmission by the insulin-like growth factors.** *Cell* 1989, **59**: 235-238.
 27. Czech MP, Lewis RE, Corvera S: **Multifunctional glycoprotein receptors for insulin and the insulin-like growth factors.** *Ciba Found Symp* 1989, **145**: 27-41.
 28. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E *et al.*: **The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling.** *Cell* 1985, **40**: 747-758.
-

-
29. Elisseeff J, McIntosh W, Fu K, Blunk BT, Langer R: **Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering.** *J Orthop Res* 2001, **19**: 1098-1104.
 30. Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM *et al.*: **Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage.** *Tissue Eng* 2002, **8**: 73-84.
 31. Gooch KJ, Kwon JH, Blunk T, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: **Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage.** *Biotechnol Bioeng* 2001, **72**: 402-407.
 32. Leipzig ND, Eleswarapu SV, Athanasiou KA: **The effects of TGF-beta1 and IGF-I on the biomechanics and cytoskeleton of single chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**: 1227-1236.
 33. Fortier LA, Balkman CE, Sandell LJ, Ratcliffe A, Nixon AJ: **Insulin-like growth factor-I gene expression patterns during spontaneous repair of acute articular cartilage injury.** *J Orthop Res* 2001, **19**: 720-728.
 34. Kellner K, Schulz MB, Gopferich A, Blunk T: **Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application.** *J Drug Target* 2001, **9**: 439-448.
 35. Coutts RD, Sah RL, Amiel D: **Effects of growth factors on cartilage repair.** *Instr Course Lect* 1997, **46**: 487-494.
 36. Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB: **Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants.** *Arch Biochem Biophys* 1994, **308**: 137-147.
 37. Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ: **Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture.** *J Orthop Res* 1996, **14**: 44-52.
 38. Cicuttini FM, Wluka A, Bailey M, O'Sullivan R, Poon C, Yeung S *et al.*: **Factors affecting knee cartilage volume in healthy men.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42**: 258-262.
 39. Richette P, Corvol M, Bardin T: **Estrogens, cartilage, and osteoarthritis.** *Joint Bone Spine* 2003, **70**: 257-262.
 40. Garstang SV, Stitik TP: **Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology.** *Am J Phys Med Rehabil* 2006, **85**: S2-11.
 41. Gokhale JA, Frenkel SR, Dicesare PE: **Estrogen and osteoarthritis.** *Am J Orthop* 2004, **33**: 71-80.
 42. Raz P, Nasatzky E, Boyan BD, Ornoy A, Schwartz Z: **Sexual dimorphism of growth plate prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes in response to testosterone requires metabolism to dihydrotestosterone (DHT) by steroid 5-alpha reductase type 1.** *J Cell Biochem* 2005, **95**: 108-119.
-

-
43. Bittberg M: **Articular cartilage repair: an update on different clinical repair methods.** *Ortop Traumatol Rehabil* 2001, **3**: 235-243.
 44. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M: **Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up.** *Knee* 2006, **13**: 194-202.
 45. Thermann H, Driessen A, Becher C: **[Autologous chondrocyte transplantation in the treatment of articular cartilage lesions of the talus].** *Orthopade* 2008, **37**: 232-239.
 46. Englert C, Greiner G, Berner A, Hammer J: **T-peel test for the analysis of articular cartilage integration.** *Stud Health Technol Inform* 2008, **133**: 95-102.
 47. Tam HK, Srivastava A, Colwell CW, Jr., D'Lima DD: **In vitro model of full-thickness cartilage defect healing.** *J Orthop Res* 2007, **25**: 1136-1144.
 48. Fierlbeck J, Hammer J, Englert C, Reuben RL: **Biomechanical properties of articular cartilage as a standard for biologically integrated interfaces.** *Technol Health Care* 2006, **14**: 541-547.
 49. Gratz KR, Wong VW, Chen AC, Fortier LA, Nixon AJ, Sah RL: **Biomechanical assessment of tissue retrieved after in vivo cartilage defect repair: tensile modulus of repair tissue and integration with host cartilage.** *J Biomech* 2006, **39**: 138-146.
 50. Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: **Integration of engineered cartilage.** *Journal of Orthopaedic Research* 2001, **19**: 1089-1097.
 51. Tognana E, Chen F, Padera RF, Leddy HA, Christensen SE, Guilak F *et al.*: **Adjacent tissues (cartilage, bone) affect the functional integration of engineered calf cartilage in vitro.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**: 129-138.
 52. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA: **Growth and integration of neocartilage with native cartilage in vitro.** *J Orthop Res* 2005, **23**: 433-439.
 53. Lillie RD, Fullmer HM: *Histopathologic techniques and practical histochemistry.* New York: McGraw Hill; 1976.
 54. Woessner JF: **The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid.** *Arch Biochem Biophys* 1961, **93**: 440-447.
 55. Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C *et al.*: **Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay.** *J Clin Invest* 1994, **93**: 1722-1732.
 56. Takahashi Y, Corvol MT, Tsagris L, Carrascosa A, Bok S, Rappaport R: **Testosterone metabolism in prepubertal rabbit cartilage.** *Mol Cell Endocrinol* 1984, **35**: 15-24.
-

57. Elliott JL, Oldham JM, Asher GW, Molan PC, Bass JJ: **Effect of testosterone on binding of insulin-like growth factor-I (IGF- I) and IGF-II in growing antlers of fallow deer (*Dama dama*)**. *Growth Regul* 1996, **6**: 214-221.
58. Itagane Y, Inada H, Fujita K, Isshiki G: **Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes**. *Endocrinology* 1991, **128**: 1419-1424.

9 Lebenslauf

Name : Achim Benditz

Geburtsdatum : 06. 09. 1977

Familienstand : ledig

Schullaufbahn : 1984 - 1988 Grundschule Eschenau
1988 - 1997 Emil-von-Behring Gymnasium Spardorf
1997 Abitur

Studium : 1998 - 2007 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg
März 2003 Physikum
Mai 2007 Staatsexamen
Beendigung des Studiums der Humanmedizin mit der Note: 3

Promotion : Oktober 2003 - Mai 2008 Dissertation mit dem Thema:
Einfluss von Wachstumsfaktoren und Steroidhormonen auf die
native Gelenkknorpelintegration im Vergleich zur Integration von
Regeneratknorpelgewebe zu Gelenkknorpel

Beruflicher Werdegang : Juni – Oktober 2007 Stabsarzt d. R. und Hörsalleiter an der
Sanitätsakademie der Bundeswehr in München

November 2007-Mai 2008 Assistenzarzt Abteilung für
Anästhesiologie und Intensivmedizin KH Burglengenfeld (CA
Dr. med. B. Kellner)

Seit Juni 2008 Assistenzarzt Abteilung für Allgemein, Viszeral-,
Gefäß- und Unfallchirurgie KH Burglengenfeld (CA Dr. med. S.
Pommer)

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer der Doktorarbeit, Herrn PD Dr. med. C. Englert für das Überlassen des Themas der Arbeit, für die sehr gute Betreuung in den letzten fünf Jahren während der erfolgreichen Umsetzung der Arbeit sowie für die zu jeder Zeit geduldige Beantwortung offener Fragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Nerlich für die Möglichkeit, in der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg promovieren zu dürfen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Mitstreiter Wolfgang Stosiek, mit dem die vielen gemeinsamen Stunden im Labor immer wieder abwechslungsreich waren und dafür, dass wir uns jederzeit sehr gut gegenseitig unterstützten.

Zudem danke ich dem Laborleiter Dr. rer. nat. R. Kujat und seinen MTAs (Daniela, Tanja, Tom, Ulrike), sowie den Doktoranden (Julia, Sabine, Sabine, Philipp) für die gute Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern, die mich das Studium lang unterstützten und somit diese Dissertation erst ermöglichten. Leider ist mein Vater viel zu früh verstorben und kann den erfolgreichen Abschluss der Promotion nicht mehr erleben. Papa ich danke dir, dass du mein Vater bist und mir so viel im Leben beigebracht hast.

Du fehlst mir so unendlich!

11 Anhang

11.1 Publikation

Hormonal effects on native and tissue engineered articular cartilage integration

*Englert, C; *Stosiek, W; *Benditz, A; *Toso S M, Fierlbeck, J; **Hammer, J; ** *Straub R,
*** Blunk, T

* University Hospital of Regensburg, Bavaria, Germany

** University of Applied Science Regensburg, Bavaria, Germany

***University of Regensburg, Bavaria, Germany

Carsten.Englert@klinik.uni-regensburg.de

Introduction: A central aim of current research is to determine the best conditions and materials for integrative repair of articular cartilage injuries (1-2). One technique for stimulating natural cartilage repair processes may be the stimulation of native tissue using sex hormones (3). Newly developed procedures such as chondrocyte transplantation or tissue engineered constructs may transpose the stimulating effect of sex hormones to the tissue engineered tissue as well. This project investigated effects of steroid hormones and insulin on articular cartilage and tissue engineered cartilage integration. **Methods:** Articular cartilage blocks were cultured in partial apposition for 2 and 4 weeks in standard medium supplemented with ascorbic acid, and various concentrations of testosterone and insulin, in order to test mechanical integration. Native articular cartilage blocks were cultured with tissue-engineered cartilage constructs using the same configuration and stimulating medium.

The constructs were built of a PGA matrix and juvenile bovine chondrocytes, precultured for 8 weeks. Formation of synthesized extracellular matrix was examined for glycosaminoglycan (GAG) and DNA content. Real-time PCR was used to investigate collagen subtype and aggrecan metabolism. **Results:** Medium supplemented with insulin 0.25 g/ml and 2.5 g/ml led to significantly increased adhesive strength for both native apposing cartilage blocks and for tissue-engineered construct blocks compared to control (standard medium). Using testosterone (10^{-8} mol/l) supplementation in native cartilage blocks revealed a median adhesive strength of 127 kPa, which was significantly increased relative to insulin stimulated groups and control. Using testosterone (10^{-8} mol/l) for tissue-engineered constructs apposed to native cartilage blocks led to a significant decrease of adhesive strength in comparison to control and the insulin supplemented group. Insulin increased adhesive strength and GAG content for native cartilage blocks in partial apposition and for tissue-engineered blocks 137 apposing native cartilage blocks. Furthermore, elevated gene expression for aggrecan using real time PCR revealed no significant changes in DNA content in these cases. However, testosterone resulted in significantly greater integrative repair for native cartilage blocks, but appeared to inhibit integrative repair for tissue-engineered blocks. Testosterone increased overall collagen gene expression (collagen type I and II) in native articular cartilage but not in tissue-engineered constructs. **Discussion:** Sex hormones are locally metabolized by cells, and are influenced by inflammatory reactions. One important conversion reaction is mediated by aromatase, converting active testosterone to inactive forms. Hormone converting enzymes or receptor expression may affect the differential effect of testosterone on native and tissueengineered tissue. **Conclusion:** This is the first study to demonstrate that steroid hormones, such as testosterone, stimulate articular cartilage but decrease tissue-engineered construct integration, illustrating differential cell metabolism of native and tissue-engineered constructs. These results imply the need for differential treatment of native to native articular cartilage wounds versus those involving tissue-engineered constructs in order to optimize

cartilage integration. **References:** 1. DiMicco, *Osteoarthritis Cartilage* 10:218, 2002. 2. Englert, *Arthritis Rheum* 52:4, 1091-1099 3. Englert, *Arthritis Rheum* 54:12, 3890-7,

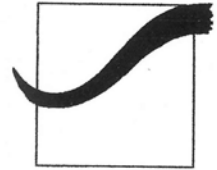
Acknowledgments: ReForM C Grant University Regensburg.

11.2 Doktorandenvertrag



UNIVERSITÄT
REGENSBURG

KLINIKUM



Klinikum der Universität Regensburg, Abteilung für Hand-, Plastische-
und Unfallchirurgie, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93042 Regensburg

An Achim Benditz

UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG
ABTEILUNG FÜR HAND-, PLASTISCHE-
und UNFALLCHIRURGIE
Vorstand: Prof. Dr. M. Nerlich

Telefon: 0941/944-6805
Telefax: 0941/944-6806
E-mail: michael.nerlich@klinik.uni-regensburg.de
cc

Regensburg, Dienstag, 3. August 2004

Vertragsvereinbarung zwischen Doktorand Achim Benditz und Betreuer Dr. Carsten Englert in der Abteilung für Unfallchirurgie

Im folgenden sollen die Leistungen des Betreuers und des Betreuten dargestellt, wie auch die Erwartungen auf beiden Seiten beschrieben werden.

Der Betreuer stellt folgende Mittel zur Verfügung:

- Thema der Dissertation
- Materialien
- Experimentelles Modell
- 196 wieder verwertbare Zellkulturkammern mit Stempel aus Polysulfon
- Einweisung in die Methoden, ggf. durch Hilfspersonal (eingewiesene MTA, Laborleiter Dr. Kujat und Dr. Schumann)
- Literaturrecherche und digitale eigene Publikationen und Vorarbeiten.

Der Betreuer verpflichtet sich zu folgenden Leistungen:

- Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit mit mindestens 1 Wochenstunde von 16.00 bis 17.00 Uhr Montag bis Donnerstag in
 - Experimenteller Arbeit im Labor
 - Wissenschaftlicher Auswertung der Daten
 - Statistisch
 - Inhaltlich
 - Einweisung in der wissenschaftlichen Präsentation
 - Unterstützung in der Dissertationsbearbeitung durch Korrekturlesung innerhalb von 14 Tagen (außerhalb der Urlaubszeit).
 - Unterstützung in der wissenschaftlichen Publikation
 - Der Betreuer verpflichtet sich zur Angabe des Betreuten in wissenschaftlichen Publikationen, wenn substanzielle Mitarbeit des Betreuten vorhanden war als Koautor, und bei Mitarbeit zumindest im Acknowledgement.

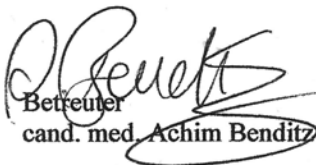
Der Betreute verpflichtet sich zu folgenden Leistungen:

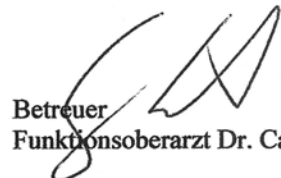
- Anerkennung des geistigen Eigentums des Betreuers des Themas und der geliehenen Vorarbeiten (Literatursammlung, Publikationen)
- Übernahme der beauftragten Arbeiten im Labor
- der schriftlich wissenschaftlichen Arbeiten
- Die experimentelle Arbeit darf nicht länger ruhen aufgrund von Examina, Famulaturen oder Urlaub als 8 Wochen am Stück.
- Einer Mindestarbeitsleistung von 12 Monaten Laborarbeit ohne Urlaub, d.h. eine realistische experimentelle Arbeit ist schneller nicht machbar. Der genannte Zeitrahmen ist ein grober Anhaltspunkt, der von allen Seiten angestrebt werden sollte.
- 3-6 Monaten nach Abschluss der experimentellen Arbeit, Vorstellung der schriftlichen Darstellung der experimentellen Daten in Form einer Dissertation nach Vorgabe und einer englischen Publikation in Zeitschriftenformat für ein ISI-gelistetes Journal.
- mindestens eines Abstracts als Kongressbeitrag als Erstauthor und Vortragender (Hauskongress, Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie).
- Rückgabe der Literaturrecherche und sämtlicher Materialien und Methoden nach Absolvierung der Dissertation an den Betreuer.

Eine Benotung der wissenschaftlichen Arbeit wird in diesem Rahmen als höchst mögliches Ziel mit „magna cum laude“ angegeben. Eine Benotung mit „summa cum laude“ setzt eine selbstständige Fortsetzung der wissenschaftlichen Arbeit mit selbstständiger Erarbeitung einer englischsprachigen „peer review“ Veröffentlichung voraus. Der Betreuer ist dennoch als Ko- oder Seniorautor zu nennen, wenn die Arbeiten mit Methoden, welche durch ihn etabliert sind, erarbeitet wurden.

Falls eine Nichterfüllung der o.g. Vereinbarungen aufgrund eines zu geringen Arbeitseinsatzes eintritt, nimmt sich der Betreuer das Recht, das vergebene Thema zu ende zu bringen, und selbstständig zu publizieren. Ein Anspruch auf Dissertation wird durch die Gutachter beurteilt. Falls experimentelle Versuche nicht zum erhofften Ergebnis führen, so liegt dies an der wissenschaftlichen Arbeit an sich und kann nicht dem Doktoranden angelastet werden. Auch negative Ergebnisse sind Ergebnisse und können zur Promotion, und ggf. nicht zur Veröffentlichung dienen.

Als Gutachter, Kogutachter für die Arbeit „Integrationmechanismen nativen Gelenkknorpels unter hormoneller als auch Cytokine Stimulation.“ können Prof: Dr. Rainer Straub, Dr. Blunk, Prof. Göpferich, PD. Dr. Angele oder Prof. Nerlich dienen.


Betreuer
cand. med. Achim Benditz


Betreuer
Funktionsoberarzt Dr. Carsten Englert